

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**PLASTICIDAD FENOTÍPICA EN DIFERENTES ETAPAS
DEL CICLO DE VIDA DE *Phyllomedusa boliviana*
y *Phyllomedusa sauvagii* (ANURA:
PHYLLOMEDUSIDAE): RESPUESTA ANTE
FACTORES BIÓTICOS Y ABIÓTICOS**

LIC. MARÍA JOSÉ SALICA

DIRECTORA: MARÍA FLORENCIA VERA CANDIOTI

CO-DIRECTOR: MARCOS VAIRA



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMÁN

Facultad De Ciencias Naturales e Instituto Miguel Lillo

Tucumán. Argentina

2019

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
ESTRUCTURA DE LA TESIS.....	3
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN Y MÉTODOS GENERALES.....	4
INTRODUCCIÓN.....	4
Especies de interés para el estudio de la plasticidad de eclosión y metamorfosis en Argentina.....	7
OBJETIVOS.....	8
HIPÓTESIS.....	9
MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES.....	10
CAPÍTULO II: DESARROLLO NORMAL EN <i>PHYLLOMEDUSA</i>.....	14
ANTECEDENTES.....	14
MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
RESULTADOS.....	17
Desarrollo embrionario de <i>P. boliviana</i> y <i>P. sauvagii</i>	17
<i>Phyllomedusa boliviana</i>	17
<i>Phyllomedusa sauvagii</i>	19
Variación temporal del desarrollo embrionario.....	22
Etapa larval de <i>P. boliviana</i> y <i>P. sauvagii</i>	22
Desarrollo embrionario en otras especies de phyllomedusidos.....	23
<i>Phyllomedusa tetraploidea</i>	23
<i>Pithecopus azureus</i>	25
FIGURAS Y TABLAS.....	28
CAPÍTULO III: ECLOSIÓN PLÁSTICA.....	47
ANTECEDENTES.....	47
MATERIALES Y MÉTODOS.....	49
RESULTADOS.....	53
Eclosión temprana por infección fúngica.....	53

Eclosión temprana por inundación.....	53
Consecuencias morfológicas de eclosionar a diferentes edades.....	53
FIGURAS Y TABLAS.....	57
CAPÍTULO IV: EFECTO ACUMULATIVO DE LA ECLOSIÓN PLÁSTICA.....	78
ANTECEDENTES.....	78
MATERIALES Y MÉTODOS.....	80
RESULTADOS.....	84
Experimento de depredación.....	84
Crecimiento y desarrollo.....	85
Metamorfosis.....	86
Experimento de hidroperíodo.....	86
Crecimiento y desarrollo.....	87
Metamorfosis.....	88
FIGURAS Y TABLAS.....	89
CAPÍTULO V: DISCUSIÓN.....	131
LA ONTOGENIA TEMPRANA EN PHYLLOMEDUSA.....	131
El gran desarrollo de las branquias externas es característico de phyllomedusidos.....	132
El patrón morfológico y ontogenético del disco oral es en general conservado en la familia.....	132
La glándula de eclosión tiene características únicas en Phyllomedusidae.....	132
Las glándulas adhesivas varían estructural y ontogenéticamente entre los phyllomedusidos.....	134
ECLOSIÓN Y ECLOSIÓN PLÁSTICA.....	136
La eclosión normal es similar en la mayoría de las especies de phyllomedusidos.....	136
Los estímulos que provocan eclosión temprana difieren interespecíficamente.....	137
La extensión del período plástico difiere interespecíficamente.....	139
El mecanismo de eclosión y las estructuras involucradas difieren interespecíficamente.....	139
La eclosión temprana induce un patrón morfológico en general compartido.....	140
DESARROLLO A LA METAMORFOSIS Y CONSECUENCIAS A LARGO PLAZO DE LA ECLOSIÓN PLÁSTICA.....	144

La eclosión temprana combina efectos transitorios y duraderos en el desarrollo larval.	144
El crecimiento y desarrollo larval se modifican ante factores bióticos y abióticos.....	146
Las señales de depredación provocan una respuesta morfológica conservada al inicio de la etapa larval.....	146
La respuesta a cambios en el hidroperíodo varía interespecíficamente.....	149
El efecto conjunto inicial de los riesgos de la vida larval y la eclosión temprana no persiste hasta la metamorfosis.....	150
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	152
LITERATURA.....	155
AGRADECIMIENTOS.....	169

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1. Resumen materiales y aproximación metodológica.....	11
--	----

CAPÍTULO II

Figura 2. Resumen material y métodos.....	29
Figura 3. Desarrollo embrionario en <i>Phyllomedusa boliviana</i>	30
Figura 4. Desarrollo del disco oral en <i>Phyllomedusa boliviana</i>	31
Figura 5. Glándula de eclosión y líneas laterales en <i>Phyllomedusa boliviana</i>	32
Figura 6. Desarrollo embrionario en <i>Phyllomedusa sauvagii</i>	33
Figura 7. Desarrollo del disco oral y glándulas adhesivas en <i>Phyllomedusa sauvagii</i>	34
Figura 8. Glándula de eclosión y líneas laterales en <i>P. sauvagii</i>	35
Figura 9. Variaciones intra- e interespecíficas en estadios/tiempo.....	36
Figura 10. Progresión de estadios y tamaño durante el desarrollo de <i>Phyllomedusa boliviana</i> y <i>P. sauvagii</i>	37
Figura 11. Desarrollo embrionario en <i>Phyllomedusa tetraploidea</i>	38
Figura 12. Desarrollo del disco oral y glándulas adhesivas en <i>Phyllomedusa tetraploidea</i>	39
Figura 13. Detalles del disco oral en <i>Phyllomedusa tetraploidea</i>	40
Figura 14. Glándula de eclosión en <i>Phyllomedusa tetraploidea</i>	41
Figura 15. Desarrollo embrionario en <i>Pithecopus azureus</i>	42
Figura 16. Desarrollo del disco oral y glándulas adhesivas en <i>Pithecopus azureus</i>	43
Figura 17. Detalles del disco oral en <i>Pithecopus azureus</i>	44

CAPÍTULO III

Figura 18. Esquema del diseño experimental empleado.....	58
Figura 19. Método de suspensión de nidos de <i>Phyllomedusa</i> para experimentos.....	59
Figura 20. Nido de <i>Phyllomedusa sauvagii</i> infectado por hongo.....	60
Figura 21. Medidas embrionarias registradas durante los experimentos.....	61
Figura 22. Morfología de embriones eclosionados temprana y espontáneamente.....	62
Figura 23. Morfometría de embriones precoces y control de <i>Phyllomedusa boliviana</i>	63
Figura 24. Morfometría de embriones precoces y control de <i>Phyllomedusa sauvagii</i>	64

Figura 25. Crecimiento larval de <i>Phyllomedusa boliviana</i> y <i>P. sauvagii</i> con diferentes edades de eclosión.....	65
Figura 26. Desarrollo de las branquias en embriones precoces y control.....	66
Figura 27. Longitud del tracto digestivo en embriones de <i>P. sauvagii</i> precoces y control.....	67
Figura 28. Desarrollo de las espiras digestivas en embriones precoces y control.....	68
Figura 29. Desarrollo del disco oral en embriones precoces y control de <i>Phyllomedusa boliviana</i>	69
Figura 30. Desarrollo del disco oral y glándulas adhesivas en embriones precoces (día 4) y control de <i>Phyllomedusa sauvagii</i>	70
Figura 31. Desarrollo del disco oral en embriones precoces (día 5) y control de <i>Phyllomedusa sauvagii</i>	71
Figura 32. Desarrollo de la glándula de eclosión y líneas laterales en embriones precoces y control de <i>Phyllomedusa boliviana</i>	72
Figura 33. Desarrollo de la glándula de eclosión y líneas laterales en embriones precoces y control de <i>Phyllomedusa sauvagii</i>	73

CAPÍTULO IV

Figura 34. Esquema del diseño experimental empleado en experimento depredación....	90
Figura 35. Mesocosmos utilizados durante los experimentos de depredación.....	91
Figura 36. Náyade de Odonata empleada como depredador.....	92
Figura 37. Esquema del diseño experimental empleado en experimento hidroperíodo....	93
Figura 38. Bandejas utilizadas durante los experimentos de hidroperíodo.....	94
Figura 39. Recipientes individuales para metamorfos.....	95
Figura 40. Morfometría de larvas de <i>Phyllomedusa boliviana</i> con diferentes edades de eclosión y señales de depredación.....	96
Figura 41. Morfometría de larvas de <i>Phyllomedusa sauvagii</i> con y sin señales de depredación.....	97
Figura 42. Metamorfosis en <i>Phyllomedusa boliviana</i> y <i>P. sauvagii</i> luego de experimentos de depredación.....	98
Figura 43. Morfometría de larvas de <i>Phyllomedusa boliviana</i> con diferentes edades de eclosión y condiciones de hidroperíodo.....	99
Figura 44. Morfometría de larvas de <i>Phyllomedusa sauvagii</i> con diferentes edades de eclosión y condiciones de hidroperíodo.....	100
Figura 45. Metamorfosis en <i>Phyllomedusa boliviana</i> y <i>P. sauvagii</i> luego de	

experimentos de hidroperíodo.....	101
-----------------------------------	-----

CAPÍTULO V

Figura 46. Resumen variaciones morfológicas según la edad de eclosión.....	142
---	-----

Figura 47. Progresión de estadios de desarrollo en <i>Phyllomedusa boliviana</i> eclosionadas precoz y normalmente.....	145
---	-----

ÍNDICE DE TABLAS

CAPÍTULO I

Tabla 1. Material biológico.....	12
---	----

CAPÍTULO II

Tabla 2. Morfometría de larvas de <i>Phyllomedusa boliviana</i>	45
--	----

Tabla 3. Morfometría de larvas de <i>Phyllomedusa sauvagii</i>	46
---	----

CAPÍTULO III

Tabla 4. Eclosión temprana por nido en <i>Phyllomedusa boliviana</i>	74
---	----

Tabla 5. Eclosión temprana por nido en <i>Phyllomedusa sauvagii</i>	75
--	----

Tabla 6. Morfometría corporal de larvas de <i>Phyllomedusa boliviana</i> con diferentes edades de eclosión.....	76
--	----

Tabla 7. Morfometría corporal de larvas de <i>Phyllomedusa sauvagii</i> con diferentes edades de eclosión.....	77
---	----

CAPÍTULO IV

Tabla 8. Detalle de tratamientos para experimentos de depredación en <i>Phyllomedusa boliviana</i>	102
---	-----

Tabla 9. Detalle de tratamientos para experimentos de hidroperíodo en <i>Phyllomedusa boliviana</i> y <i>P. sauvagii</i>	103
---	-----

Tabla 10. Mortalidad durante experimentos de depredación en <i>Phyllomedusa boliviana</i>	104
--	-----

Tabla 11. Efecto de tratamientos de eclosión x depredación en la longitud total de <i>Phyllomedusa boliviana</i> (días 0–44).....	105
--	-----

Tabla 12. Efecto de tratamientos de eclosión x depredación en variables de forma de <i>Phyllomedusa boliviana</i> (día 0).....	106
---	-----

Tabla 13. Efecto de tratamientos de eclosión x depredación en variables de forma de <i>Phyllomedusa boliviana</i> (día 14).....	107
--	-----

Tabla 14. Efecto de tratamientos de eclosión x depredación en variables de forma de <i>Phyllomedusa boliviana</i> (día 25).....	108
--	-----

Tabla 15. Efecto de tratamientos de eclosión x depredación en variables de forma de <i>Phyllomedusa boliviana</i> (día 44).....	109
--	-----

Tabla 16. Efecto de tratamientos de depredación en la longitud total de <i>Phyllomedusa sauvagii</i> (días 0–48).....	110
Tabla 17. Efecto de tratamientos de depredación en variables de forma de <i>Phyllomedusa sauvagii</i> (día 0).....	111
Tabla 18. Efecto de tratamientos de depredación en variables de forma de <i>Phyllomedusa sauvagii</i> (día 21).....	112
Tabla 19. Efecto de tratamientos de depredación en variables de forma de <i>Phyllomedusa sauvagii</i> (día 34).....	113
Tabla 20. Efecto de tratamientos de depredación en variables de forma de <i>Phyllomedusa sauvagii</i> (día 48).....	114
Tabla 21. Efecto de tratamientos de eclosión x depredación en la metamorfosis de <i>Phyllomedusa boliviana</i>	115
Tabla 22. Efecto de tratamientos de depredación en la metamorfosis de <i>Phyllomedusa sauvagii</i>	116
Tabla 23. Mortalidad durante experimentos de hidroperíodo en <i>Phyllomedusa boliviana</i> y <i>P. sauvagii</i>	117
Tabla 24. Efecto de tratamientos de eclosión x hidroperíodo en la longitud total de <i>Phyllomedusa boliviana</i> (días 0–79).....	118
Tabla 25. Efecto de tratamientos de eclosión x hidroperíodo en variables de forma de <i>Phyllomedusa boliviana</i> (día 0).....	119
Tabla 26. Efecto de tratamientos de eclosión x hidroperíodo en variables de forma de <i>Phyllomedusa boliviana</i> (día 9).....	120
Tabla 27. Efecto de tratamientos de eclosión x hidroperíodo en variables de forma de <i>Phyllomedusa boliviana</i> (día 23).....	121
Tabla 28. Efecto de tratamientos de eclosión x hidroperíodo en variables de forma de <i>Phyllomedusa boliviana</i> (día 51).....	122
Tabla 29. Efecto de tratamientos de eclosión x hidroperíodo en variables de forma de <i>Phyllomedusa boliviana</i> (día 79).....	123
Tabla 30. Efecto de tratamientos de eclosión x hidroperíodo en la longitud total de <i>Phyllomedusa sauvagii</i> (días 0–91).....	124
Tabla 31. Efecto de tratamientos de eclosión x hidroperíodo en variables de forma de <i>Phyllomedusa sauvagii</i> (día 0).....	125
Tabla 32. Efecto de tratamientos de eclosión x hidroperíodo en variables de forma de <i>Phyllomedusa sauvagii</i> (día 36).....	126
Tabla 33. Efecto de tratamientos de eclosión x hidroperíodo en variables de forma de	

<i>Phyllomedusa sauvagii</i> (día 64).....	127
Tabla 34. Efecto de tratamientos de eclosión x hidroperíodo en variables de forma de <i>Phyllomedusa sauvagii</i> (día 77).....	128
Tabla 35. Efecto de tratamientos de eclosión x hidroperíodo en variables de forma de <i>Phyllomedusa sauvagii</i> (día 91).....	129
Tabla 36. Efecto de tratamientos de eclosión x hidroperíodo en la metamorfosis de <i>Phyllomedusa boliviana</i>	130

CAPÍTULO V

Tabla 37. Resumen de efectos de experimentos de eclosión, depredación y desecación en <i>Phyllomedusa boliviana</i> y <i>P. sauvagii</i>	145
--	-----

RESUMEN

Los anuros presentan un ciclo de vida complejo caracterizado por puntos de transición que involucran profundos cambios morfológicos, fisiológicos, ecológicos y comportamentales. La eclosión y la metamorfosis representan eventos cruciales, y tanto éstos como las etapas que delimitan pueden presentar variaciones morfológicas y ecológicas en respuesta a cambios en el ambiente, lo que se conoce como plasticidad fenotípica. A su vez, la plasticidad en etapas tempranas del desarrollo puede producir consecuencias en etapas subsecuentes. Con el objetivo de estudiar de manera integrada el ciclo de vida anuro, las etapas que lo caracterizan, y sus relaciones con variables ecológicas, empleamos como modelo dos especies de ranas mono, *Phyllomedusa sauvagii* y *P. boliviana* (Phyllomedusidae). El proyecto enfatiza en el desarrollo embrionario y larval, la eclosión y la metamorfosis, y cómo éstos varían en respuesta a estímulos bióticos y abióticos. Para esto se realizaron diseños experimentales en laboratorio y mesocosmos, sometiendo individuos en diferentes etapas ontogenéticas a condiciones variables de depredación e hidroperíodo, y comparando las respuestas fenotípicas con series de individuos control. Las observaciones en condiciones normales muestran que el desarrollo embrionario es muy similar al de otros phyllomedusidos, con algunas diferencias en la configuración de las glándulas adhesivas y de eclosión. Ambas especies presentan la capacidad de adelantar el momento de eclosión en respuesta a la inundación de sus nidos. Si bien los embriones que eclosionan precozmente muestran un menor desarrollo que los que eclosionarán normalmente, el ingreso temprano al agua acelera el incremento de tamaño y desarrollo del sistema respiratorio y digestivo. Estas diferencias son evidentes al comienzo de la vida libre, pero se desdibujan a medida que avanza el desarrollo. Las larvas alteran su fenotipo en respuesta a señales de depredación e hidroperíodo y estas respuestas difieren dependiendo de la especie y la edad de eclosión. En *P. boliviana* el desarrollo es en general más susceptible a las señales de depredación, con cambios morfológicos que se concentran al inicio de la etapa larval y se mantienen produciendo una metamorfosis más lenta y a mayor tamaño. Por su parte, en *P. sauvagii* los efectos de la depredación y aparentemente de los cambios en el hidroperíodo se compensan hacia el final del desarrollo. Estos resultados son semejantes a los encontrados en una especie relacionada, y subrayan que el desarrollo es crítico en etapas posteclosión. En *P. boliviana* esto trae consecuencias acumulables a etapas posteriores, mientras que en *P. sauvagii* la mayor resistencia a los cambios podría relacionarse a los ambientes comparativamente más inestables que explota. Este estudio representa un trabajo inédito en la región, y contribuye a ampliar la comprensión sobre factores ambientales que afectan dinámicas poblacionales, dando lugar a una gran variedad de líneas de investigación futuras.

ABSTRACT

Anurans have complex life cycles characterized by transition points that involve deep morphological, physiological, ecological and behavioral changes. Hatching and metamorphosis represent crucial points, and both these and the stages they delimit can present morphological and ecological variations in response to changes in the environment, known as phenotypic plasticity. In turn, plasticity in early stages of development can produce consequences in subsequent stages. With the objective of studying in an integrated way the anurous life cycle, the stages that characterize it, and its relations with ecological variables, we use as model two species of monkey frogs, *Phyllomedusa sauvagii* and *P. boliviana* (Phyllomedusidae). The project emphasizes embryonic and larval development, hatching and metamorphosis, and how these vary in response to biotic and abiotic stimuli. For this, experimental designs were made in the laboratory and mesocosms, subjecting individuals in different ontogenetic stages to variable conditions of predation and hydroperiod, and comparing the phenotypic responses with series of control individuals. Observations under normal conditions show that the embryonic development is very similar to that of other phyllomedusids, with some differences in the configuration of the adhesive and hatching glands. Both species have the capacity to advance the moment of hatching in response to the flooding of their nests. Although embryos that hatch early show less development than those that normally hatch, early entry into the water accelerates the increase in size and development of the respiratory and digestive systems. These differences are evident at the beginning of free life, but become blurred as development progresses. The larvae alter their phenotype in response to signs of predation and hydroperiod and these responses differ depending on the species and age of hatching. In *P. boliviana* development is generally more susceptible to signs of predation, with morphological changes that are concentrated at the beginning of the larval stage and continue to produce a slower metamorphosis and larger. On the other hand, in *P. sauvagii* the effects of the predation and apparently of the changes in the hydroperiod are compensated towards the end of the development. These results are similar to those found in a related species, and underline that development is critical in post-hatching stages. In *P. boliviana* this brings cumulative consequences to later stages, while in *P. sauvagii* the greater resistance to changes could be related to the comparatively more unstable environments that it exploits. This study represents unprecedented work in the region, and contributes to broadening the understanding of environmental factors that affect population dynamics, giving rise to a wide variety of future research lines.

ESTRUCTURA DE LA TESIS

La presente Tesis se inicia con el Capítulo 1, que incluye una Introducción General acerca de la temática propuesta, Objetivos, Hipótesis, y Materiales y Métodos Generales. Los tres capítulos siguientes abordan específicamente y de manera secuencial los objetivos propuestos, incluyendo 1) las características del desarrollo embrionario y larval normales en las especies consideradas – Capítulo 2; 2) la eclosión plástica, analizando factores que pueden modificar el momento en que ocurre y relevando las consecuencias que eclosionar a diferentes edades implican en la morfología embrionaria – Capítulo 3; 3) los efectos de las condiciones de eclosión en el desarrollo a la metamorfosis, y su interacción con factores de riesgo durante la vida larval – Capítulo 4. Estos capítulos presentan sucintamente los antecedentes específicos para cada tema, los métodos empleados y los resultados obtenidos, pero a fin de encarar una interpretación que integre la información recabada en cada aproximación, una discusión única se presenta en el capítulo final – Capítulo 5.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN Y MÉTODOS GENERALES

INTRODUCCIÓN

Muchas especies animales presentan ciclos de vida complejos (Wilbur, 1980), en donde sus individuos experimentan cambios relacionados con el hábitat, la dieta y los depredadores (cambios de nicho ontogenético *sensu* Werner y Gillian, 1984). A lo largo de las diferentes etapas de estos ciclos, los individuos ocupan distintos ambientes, cada uno con diferentes fuerzas evolutivas actuando sobre ellos (Vonesh y Warkentin, 2006). Como resultado de esto, en una misma especie existen individuos con características fenotípicas (morfología, fisiología y comportamiento) propias de cada etapa y muy diferentes a las de la etapa siguiente. Un ejemplo de estos ciclos complejos lo constituyen los anfibios anuros, en donde un ciclo de vida típico incluye en general embriones que se desarrollan dentro de huevos (terrestres o acuáticos), que eclosionan dando origen a larvas de vida acuática, que posteriormente metamorfosean en individuos de hábitos terrestres. Si bien esta simplificación presenta numerosas variaciones (Haddad y Prado, 2005) en el desarrollo de esta tesis se hará referencia exclusivamente al ciclo de vida de un anuro siguiendo este esquema generalizado.

El ciclo de vida de un anuro comienza en su primera etapa con la postura de huevos por parte de los adultos, tanto dentro como fuera del agua dependiendo del modo reproductivo de cada especie. Los embriones se desarrollan dentro de estos huevos cubiertos por una membrana vitelina (= de fecundación) proteica y semipermeable, rodeada a su vez por una o varias cápsulas de mucopolisacáridos y mucoproteínas (Salthe, 1963). Estas estructuras de origen materno, si bien le proporcionan protección al embrión (Ward y Sexton, 1981), también generan restricciones, como por ejemplo, para el intercambio gaseoso (Seymour, 1994) y la motilidad. Otra característica de esta etapa, es que el embrión no necesita alimentarse, ya que cuenta con un vitelo, también de origen materno, a partir del cual obtiene todos los nutrientes necesarios para su desarrollo hasta el momento de la eclosión (Duellman y Trueb, 1996). Una vez que se produce la eclosión, y pasado un período de ontogenia embrionaria post-eclosión, los embriones se transforman en una larva que se enfrenta a un ambiente con características muy diferentes a las del interior del huevo. En la mayoría de las especies, durante esta etapa larval los organismos se caracterizan por tener vida libre y generalmente habitan un ambiente

acuático. La estructura corporal de una larva incluye un aparato bucal especializado con dientes labiales queratinizados, un intestino largo y enroscado y locomoción caudal (Altig y McDiarmid, 1999). Este plan corporal general les permite desplazarse fácilmente en el agua, mientras incorporan una gran cantidad de nutrientes a partir de partículas orgánicas en suspensión con un mínimo costo energético (Wassersug, 1975). Esta segunda etapa también se caracteriza por presentar una alta mortalidad (Licht, 1974) causada principalmente por depredación (Heyer *et al.*, 1975) y desecación de los cuerpos de agua donde viven. La metamorfosis es el siguiente punto de transición en el ciclo de vida de los anuros. Las larvas, una vez que alcanzan un tamaño óptimo, metamorfosean en individuos de hábitos terrestres. La transformación corporal que se produce durante la metamorfosis incluye cambios en el aparato bucal, locomotor, digestivo y respiratorio, entre otros. La metamorfosis es un momento de gran susceptibilidad a depredadores, dados los cambios morfológicos que implican la reabsorción de la cola y emergencia de los miembros, y la incapacidad de alimentarse. Como resultado de este proceso, individuos con características fenotípicas aptas para la vida en la tierra abandonan el cuerpo de agua. Finalmente, los juveniles crecen hasta alcanzar la madurez sexual y se convierten en adultos reproductores. Esta etapa ha sido identificada como la etapa que presenta la mayor capacidad de dispersión y cuyo fin último es la reproducción (Wilbur, 1980).

Todos los organismos en cada etapa de su desarrollo se encuentran expuestos a variaciones en el ambiente y tienen la capacidad de expresar diferentes fenotipos ante estas variaciones, lo que se conoce como plasticidad fenotípica (Stearns, 1989). En anuros la plasticidad fenotípica durante el período larval ha sido ampliamente reportada en la literatura. Como ejemplos, podemos incluir estudios sobre larvas de anuros de diferentes especies que alteran su morfología externa (Van Buskirk *et al.*, 1997), su comportamiento (Laurila, 2000) y su tasa de crecimiento corporal (Vonesh y Warkentin, 2006) en respuesta a la presencia de depredadores. Por otra parte, los puntos de transición que se dan entre diferentes etapas del ciclo de vida de los anuros, como la eclosión y la metamorfosis, también han sido el foco de estudios de plasticidad fenotípica.

La eclosión fue históricamente considerada como un evento fijo que ocurría en una etapa determinada e invariable del ciclo de vida. Sin embargo, nuevos estudios demostraron que el momento en el que se produce puede estar condicionado por diversos factores ambientales (Warkentin, 2011a). Hasta la fecha, se han documentado cerca de 40 especies de anfibios que presentan algún grado de plasticidad en la eclosión (Warkentin, 2011b). Las respuestas varían interespecífica (Gomez-Mestre *et al.*, 2008) e intraespecíficamente según el tipo de estímulo (e.g.,

Warkentin, 1995, 2000a; Warkentin *et al.*, 2001; Salica *et al.*, 2017). A su vez, los costos y beneficios de la plasticidad en la eclosión repercuten en la supervivencia y desempeño en etapas posteriores, incluyendo la etapa larval y metamorfosis. Cuando los embriones eclosionan antes escapan de los depredadores de nidos pero se tornan más vulnerables a los depredadores acuáticos en la siguiente etapa de vida (Warkentin, 1995, 1999; Gomez-Mestre *et al.*, 2008). Asimismo, los embriones con eclosión temprana comienzan a alimentarse antes y consecuentemente inician el crecimiento más rápido (Warkentin, 1999). Las larvas de embriones eclosionados más temprano pueden metamorfosear con mayor tamaño, pero alternativamente la exposición a depredadores puede reducir la supervivencia hasta la metamorfosis. (Touchon *et al.*, 2013).

El mecanismo de eclosión y la facultad de eclosión plástica están íntimamente relacionados con las características morfológicas de los embriones. Durante esta etapa del desarrollo temprano se diferencian un conjunto de estructuras transitorias que intervienen en funciones diversas de los embriones dentro del huevo, incluyendo intercambio gaseoso, percepción de estímulos, adhesión a superficies, y ruptura de las membranas del huevo para la liberación (e.g., Martin, 1999; Nokhbatolfoghahai y Downie, 2005, 2007, 2008; Cohen *et al.*, 2016). Las variaciones interespecíficas en la morfología y ontogenia de estas estructuras pueden relacionarse con variaciones comportamentales, incluso limitando la ocurrencia de la eclosión hasta tanto se adquiera una morfología competente (Warkentin *et al.*, 2017).

Respecto de la metamorfosis, actualmente se reconoce que es un evento fundamentalmente plástico (Benard, 2004; Pechenik, 2006). Se cree que cada especie presenta un tamaño mínimo en el que la metamorfosis es posible, así como también un tamaño máximo en el que no es posible o eficiente permanecer en la etapa larval. Una vez que las larvas alcanzan este tamaño mínimo se enfrentan a dos opciones: (i) si las condiciones ambientales no son buenas se produce la metamorfosis, (ii) si las condiciones ambientales son buenas las larvas permanecen en el agua ingiriendo más recursos alimenticios y aumentando de tamaño (Wells, 2007). Entre las variables ambientales que afectan el tiempo y tamaño de la metamorfosis se incluyen la temperatura, disponibilidad de alimento, densidad larval, duración del hidroperíodo y la intensidad de depredación (Wells, 2007).

En Argentina, los estudios realizados sobre plasticidad fenotípica en anuros suelen enfocarse principalmente en los estadios larvales (e.g., Perotti *et al.*, 2011; Cuello *et al.*, 2014; Kehr *et al.*, 2014, Gómez y Kehr, 2019). Sin embargo, el cúmulo de información disponible en la actualidad da cuenta de la importancia de realizar estudios de plasticidad fenotípica que integren varias etapas del desarrollo. En

especial, teniendo en cuenta que la plasticidad en etapas temprana del desarrollo puede producir importantes consecuencias ecológicas en etapas posteriores del ciclo de vida (Touchon *et al.*, 2013).

Especies de interés para el estudio de la plasticidad de eclosión y metamorfosis en Argentina

La rana de ojos rojos *Agalychnis callidryas* es la especie de anuro más altamente estudiada al respecto de la plasticidad fenotípica. Pertenece a la familia Phyllomedusidae, comúnmente conocida como de las ranas mono, que al momento incluye 65 especies distribuidas desde México hasta la Argentina (Duellman *et al.*, 2016; Faivovich *et al.*, 2010; Frost, 2019). En Argentina existen 4 especies de phyllomedusidos, y dos especies de *Phyllomedusa* coexisten en el Noroeste Argentino. *Phyllomedusa boliviensis* y *Phyllomedusa sauvagii* representan excelentes ejemplos para realizar estudios de plasticidad en varias etapas del desarrollo, dada su relación filogenética con *A. callidryas*, el acceso a poblaciones y manipulación relativamente fáciles, y las particularidades de su ciclo reproductivo. Como otras especies del género, estas ranas presentan un particular modo de oviposición en el que los huevos son depositados por los adultos en amplexo en nidos construidos en hojas que penden en la vegetación que rodea los charcos (Lavilla y Ceí, 2001). Los nidos están compuestos por una o varias hojas plegadas y en su interior presentan huevos fertilizados de color blanco, cápsulas de gelatina de origen materno ubicadas entre los huevos y un tapón superior e inferior compuestos por una aglutinación de las mismas cápsulas de gelatina antes mencionadas (Agar, 1909; Kenny, 1968). Las cápsulas mantienen la humedad del nido y además aportarían nutrientes a los embriones (Pucci Alcaide *et al.*, 2011). Después de varios días en el interior de las hojas plegadas, los embriones completan su desarrollo, se produce la eclosión espontánea y los individuos se desprenden de la hoja y caen al agua. El ciclo de vida continúa con larvas que se desarrollan en ambientes lénticos hasta el momento de la metamorfosis y la emergencia de los juveniles al ambiente terrestre (generalmente trepados a la vegetación periférica de los charcos en los primeros días de emerger). Los adultos se caracterizan por presentar hábitos casi exclusivamente arborícolas durante la temporada reproductiva (Vaira, 2001). Durante el resto del año, se refugian en la vegetación circundante a cursos de agua, ocultos entre ramas (M. Vaira, com. pers.). La biología de ambas especies ha sido muy estudiada, incluyendo datos de su historia natural (e.g., Laurent, 1967), reproducción (e.g. Barrio, 1976; Halloy y Espinoza, 2000; Vaira, 2001) y morfología larval (e.g. Cannatella, 1983; Lavilla, 1983).

Con respecto a la ontogenia temprana, al inicio de este trabajo no existían datos detallados en ninguno de los dos casos.

Phyllomedusa boliviana Boulenger, 1902 se distribuye en las laderas amazónicas y zonas bajas de Bolivia, al oeste y sudeste de Mato Grosso y Rondonia en Brasil, y al norte de Argentina (Frost, 2019). Su distribución en Argentina se limita a las provincias de Salta y Jujuy, y ha sido categorizada recientemente como especie Vulnerable según las categorías de amenaza a la conservación consideradas en nuestro país (Vaira *et al.*, 2012). Su temporada reproductiva se extiende desde Diciembre a Febrero (Vaira, 2001). Por su parte, *Phyllomedusa sauvagii* Boulenger, 1882 es un taxón de distribución principalmente chaqueña en el este de Bolivia, norte de Paraguay, Mato Grosso do Sul en Brasil, y norte de Argentina (Frost, 2019). En Argentina se distribuye en las provincias de Chaco, Córdoba, Corrientes, Formosa, Jujuy, Catamarca, La Rioja, San Juan, San Luis, Salta, Tucumán, Santiago del Estero y Santa Fe. Es una especie categorizada como No Amenazada según Vaira *et al.* (2012). Se reproduce desde finales de Octubre a Febrero (Halloy y Espinoza, 2000). En los sitios de muestreo de esta Tesis podemos encontrar a *P. sauvagii* en la eco-región de las Yungas, extendiéndose hasta zonas de transición entre la eco-región de las Yungas y el Chaco. Por su parte, *P. boliviana* sólo se encuentra presente en la eco-región de las Yungas. Si bien las distribuciones se solapan en parte, nunca encontramos nidos de ambas especies en los mismos/próximos cuerpos de agua. Adicionalmente, en parte de la tesis se utilizó por comparación material de las 2 especies restantes que componen la fauna de phyllomedusidos en Argentina. *Phyllomedusa tetraploidea* Pombal y Haddad, 1992 se distribuye en los estados de San Pablo y Paraná en Brasil, en la provincia de Misiones en la Argentina y en el extremo sudeste de Paraguay (Frost, 2019). Esta categorizada como especie No Amenazada por Vaira *et al.* (2012). Se reproduce durante la temporada estival (Dias *et al.*, 2013). Por último, *Phitecopus azureus* (Cope, 1862) es un pequeño phyllomedusido distribuido en las regiones chaqueñas del este de Bolivia, Paraguay, norte de Argentina y centro y oeste de Brasil. En nuestro país la especie se encuentra en la provincia de Salta, Formosa, Chaco, norte de Santiago del Estero, Santa Fe y Corrientes. Se la considera en la categoría de No Amenazada según Vaira *et al.* (2012). La temporada reproductiva coincide con la temporada estival (Rodrigues *et al.*, 2007).

OBJETIVOS

En función de lo expuesto, y destacando el valor de *Phyllomedusa boliviana* y *P. sauvagii* como especies modelo para el desarrollo de nuevos estudios de la

plasticidad fenotípica en anfibios anuros que integren varias etapas del desarrollo, se propone el presente estudio con los siguientes objetivos:

Objetivo general

El objetivo general de este proyecto es comparar el ciclo de desarrollo de dos especies de ranas arborícolas, *Phyllomedusa boliviana* y *Phyllomedusa sauvagii*, con énfasis en el análisis de la plasticidad fenotípica ocurrida durante la eclosión y la metamorfosis, dos puntos cruciales en el desarrollo, con el fin de mejorar la comprensión de los complejos ciclos de vida en anuros.

Objetivos particulares

(1) Desarrollo normal

- Describir el desarrollo embrionario y larval de *Phyllomedusa boliviana* y *Phyllomedusa sauvagii* teniendo en cuenta un conjunto de estructuras morfológicas externas, y determinar el rango de variación en el tiempo de eclosión y de metamorfosis en condiciones controladas.
- Describir el desarrollo embrionario de otras especies de phyllomedusidos, con el fin de discutir variaciones morfológicas y ontogenéticas de interés ecológico y sistemático dentro del grupo.

(2) Eclosión plástica

- Investigar los factores bióticos (riesgo de depredación) y/o abióticos (precipitaciones e inundación) que podrían afectar el momento de la eclosión.
- Determinar cuáles son las consecuencias morfológicas de eclosionar a distintas edades, considerando fundamentalmente estructuras relacionadas a la alimentación, locomoción e intercambio gaseoso.

(3) Efecto Acumulativo de la Eclosión Plástica

- Investigar la influencia del riesgo de depredación y cambios en el hidropériodo sobre el crecimiento y el desarrollo de larvas con diferentes edades de eclosión.
- Determinar si el riesgo de depredación y los cambios en el hidropériodo modifican el tiempo y el tamaño en el que se inicia la metamorfosis en individuos con diferentes edades de eclosión.

HIPÓTESIS

El enfoque fundamentalmente experimental de esta tesis permite proponer las siguientes hipótesis de trabajo, en relación a los objetivos particulares 2 y 3:

- La eclosión en *Phyllomedusa* es un evento plástico, tal que los embriones pueden adelantar el momento en que ocurre en respuesta a depredadores y exceso de agua.
- La eclosión precoz induce cambios en la morfología embrionaria que inicialmente compensan el menor desarrollo con el que los embriones entran a la vida libre.
- Aún con esta compensación inicial la eclosión temprana supone una desventaja durante la vida larval, y embriones eclosionados precozmente son más susceptibles ante riesgos de depredación y desecación.
- Las condiciones de eclosión y su interacción con los factores de riesgo durante la vida larval repercuten finalmente en el tamaño y tiempo en que se inicia la metamorfosis.

MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES

Este estudio se realizó a partir de colectas de nidos realizadas en poblaciones naturales de las dos especies de phyllomedusidos ubicadas en la provincia de Jujuy, durante las temporadas reproductivas de 2014 a 2018. Los lugares de colecta para nidos de *Phyllomedusa sauvagii* se localizan en una franja de 10 km de extensión en la porción baja de las Serranías de Zapla (Jujuy, coordenada central 24°16' S, 65°6' O). Mientras que los lugares de colecta de nidos de *Phyllomedusa boliviana* se ubican en El Cucho, Río Yuto y Río Sauzalito a la vera de la Ruta Nacional 34. El área de estudio corresponde al estrato inferior de la eco-región de las Yungas, el Bosque Pedemontano, que presenta precipitaciones promedio de 1000 mm por año, concentradas durante la temporada estival. Los nidos colectados fueron trasladados a instalaciones dentro del Museo “Pasquini López” ubicado en la ciudad de San Salvador de Jujuy, en donde se realizaron los diferentes experimentos. Parte del material fue fijado y conservado en formol 10%, y el mismo será ingresado en una colección biológica para referencia una vez finalizados los estudios. Los materiales y métodos empleados en cada estudio se resumen en el siguiente esquema (Fig. 1) y se detallan específicamente en las secciones correspondientes. La Tabla 1 sintetiza los datos de todo el material utilizado.

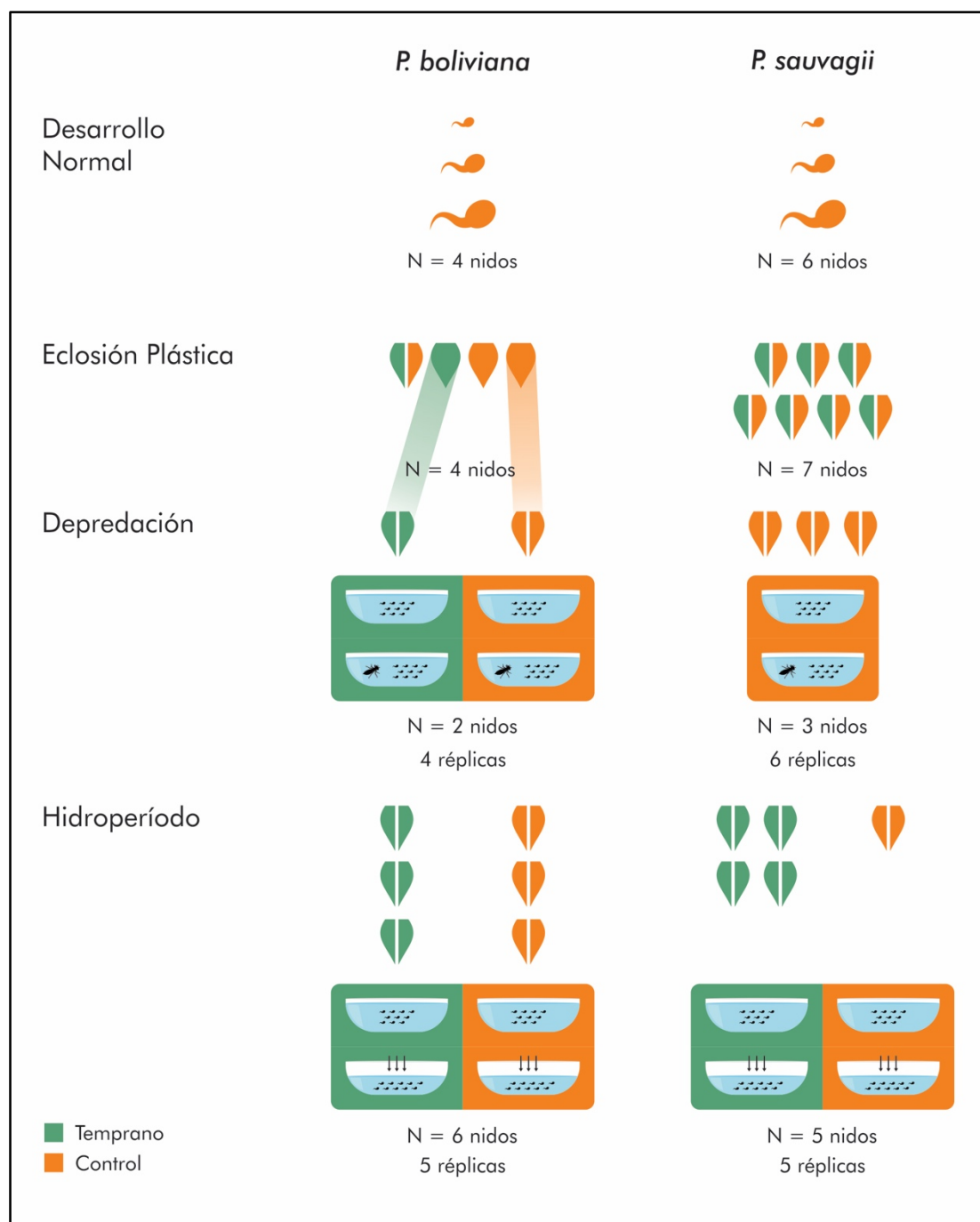


Figura 1. Resumen de los materiales y aproximación metodológica empleados en esta Tesis. Detalles pertinentes a cada sección se proporcionan en los capítulos correspondientes.

Tabla 1. Material utilizado durante el desarrollo de la Tesis. Además se colectaron 14 nidos de *P. boliviana* y 33 de *P. sauvagii* más que fueron utilizados para experimentos que fallaron por diferentes motivos; en algunos casos estaban en estadios muy avanzados y eclosionaban el mismo día de la colecta. Todos estos nidos extras también sirvieron para monitorear a las poblaciones y descartar la presencia de depredación y patógenos en el área de estudio.

Especie	# Nido	Fecha de colecta	Lugar de colecta	Experimento (Tratamientos)
<i>P. boliviana</i>	1	15/12/14	Jujuy: Libertador General San Martín	- Desarrollo embrionario y larval - Inundación - Consecuencias (Control y Temprano)
<i>P. boliviana</i>	2	15/12/14	Jujuy: Libertador General San Martín	- Desarrollo embrionario y larval - Consecuencias (Control)
<i>P. boliviana</i>	3	28/1/18	Jujuy: Libertador General San Martín	- Desarrollo embrionario y larval - Consecuencias (Control) - Depredación (Control)
<i>P. boliviana</i>	4	28/1/18	Jujuy: Libertador General San Martín	- Desarrollo embrionario - Inundación - Consecuencias (Temprano) - Depredación (Temprano)
<i>P. boliviana</i>	5	16/12/16	Jujuy: Río Yuto	- Hidroperíodo (Control)
<i>P. boliviana</i>	6	16/12/16	Jujuy: Río Yuto	- Hidroperíodo (Control)
<i>P. boliviana</i>	7	16/12/16	Jujuy: Río Yuto	- Hidroperíodo (Control)
<i>P. boliviana</i>	8	16/12/16	Jujuy: Río Yuto	- Inundación - Hidroperíodo (Temprano)
<i>P. boliviana</i>	9	16/12/16	Jujuy: Río Yuto	- Inundación - Hidroperíodo (Temprano)
<i>P. boliviana</i>	10	16/12/16	Jujuy: Río Yuto	- Inundación - Hidroperíodo (Temprano)
<i>P. boliviana</i>	11	16/12/16	Jujuy: Río Yuto	- Precipitación
<i>P. sauvagii</i>	1	21/12/10	Tucumán: Horco Molle	- Desarrollo embrionario
<i>P. sauvagii</i>	2	19/12/14	Jujuy: Carahunco	- Desarrollo embrionario - Inundación - Consecuencias (Control y Temprano)
<i>P. sauvagii</i>	3	19/12/14	Jujuy: Carahunco	- Desarrollo embrionario y larval - Inundación - Consecuencias (Control y Temprano)

<i>P. sauvagii</i>	4	19/12/14	Jujuy: Carahunco	- Desarrollo embrionario y larval - Inundación - Consecuencias (Control y Temprano)
<i>P. sauvagii</i>	5	19/12/14	Jujuy: Carahunco	- Desarrollo embrionario y larval - Inundación - Consecuencias (Control y Temprano)
<i>P. sauvagii</i>	6	19/12/14	Jujuy: Carahunco	- Desarrollo embrionario y larval - Inundación - Consecuencias (Control y Temprano)
<i>P. sauvagii</i>	7	13/1/15	Jujuy: Zapla	- Inundación - Consecuencias (Control y Temprano)
<i>P. sauvagii</i>	8	21/11/15	Jujuy: Carahunco	- Precipitación
<i>P. sauvagii</i>	9	3/2/16	Jujuy: Carahunco	- Depredación (Control)
<i>P. sauvagii</i>	10	3/2/16	Jujuy: Carahunco	- Depredación (Control)
<i>P. sauvagii</i>	11	3/2/16	Jujuy: Carahunco	- Depredación (Control)
<i>P. sauvagii</i>	12	5/12/17	Jujuy: Carahunco	- Hidroperíodo (Control)
<i>P. sauvagii</i>	13	5/12/17	Jujuy: Carahunco	- Inundación - Hidroperíodo (Temprano)
<i>P. sauvagii</i>	14	5/12/17	Jujuy: Carahunco	- Inundación - Hidroperíodo (Temprano)
<i>P. sauvagii</i>	15	5/12/17	Jujuy: Carahunco	- Inundación - Hidroperíodo (Temprano)
<i>P. sauvagii</i>	16	5/12/17	Jujuy: Carahunco	- Inundación - Hidroperíodo (Temprano)

CAPÍTULO II

EL DESARROLLO NORMAL EN *PHYLLOMEDUSA*

Parte del contenido de este capítulo referido al desarrollo embrionario de *Phyllomedusa sauvagii* y *Phitecopus azureus*, y al desarrollo de las glándulas adhesivas para las cuatro especies de phyllomedusidos de Argentina ya fue publicado en:

- Salica MJ, Haad B, Vera Candiotti MF y Faivovich J. 2011. Early development of two species of *Phyllomedusa* (Anura: Phyllomedusinae). *Salamandra* 47: 144–154.
- Vera Candiotti F, Taboada C, Salica MJ, Baldo D, Faivovich J y Baêta D. 2017. The Adhesive Glands during Embryogenesis in Some Species of Phyllomedusinae (Anura: Hylidae). *Journal of Herpetology* 51(1): 119–129.

ANTECEDENTES

El desarrollo embrionario en anuros se caracteriza por presentar caracteres morfológicos que continúan su desarrollo durante las etapas larvarias (por ejemplo, el disco oral, el sistema de líneas laterales) y estructuras transitorias que aparecen en etapas embrionarias y desaparecen después de la eclosión (por ejemplo, glándulas adhesivas, branquias externas, ciliación corporal). Estudios comparativos realizados sobre varios de estos caracteres revelan una sorprendente variación (Nokhbatolfoghahai y Downie, 2005; 2007; 2008, Nokhbatolfoghahai *et al.*, 2005; 2006). Históricamente, el estudio de la ontogenia temprana de anuros ha sido abordado desde la embriología experimental, la bioquímica y la biología molecular. La gran mayoría de la información disponible se refiere a organismos modelo como *Xenopus laevis* (Xenoanura, Pipidae; Weisz, 1945; Nieuwkoop y Faber, 1956; Dickinson y Sive, 2006) y especies de *Bufo* (Limbaugh y Volpe, 1957) y *Rana* (Taylor y Kollros, 1946). Estos estudios han generado un gran avance en el campo de la genética del desarrollo de anfibios en particular y de vertebrados en general (Chipman *et al.*, 2000). Sin embargo, para el caso de estudios de ontogenia temprana, *Xenopus laevis* resulta ser una especie muy poco representativa de los anuros ya que presenta numerosas características que la posicionan como una especie altamente derivada (Cannatella y de Sá, 1993; Svensson y Haas, 2005). Recientemente existe un renovado interés en estudios comparativos de embriones, que enfatizan la variación

espacio-temporal durante los primeros eventos del desarrollo, en varios sistemas de caracteres y en diferentes niveles taxonómicos (Chipman, 2002; Chipman *et al.*, 2000; Mitgutsch *et al.*, 2009). Es así que podemos encontrar una gran variabilidad referida a la coloración, tamaño y forma (Richardson *et al.*, 1997; Salica *et al.*, 2011, Vera Candiotti *et al.*, 2016; Navarro Acosta *et al.*, 2017; Vera Candiotti *et al.*, 2018) de los embriones, así como también en el tipo de glándulas adhesivas (Nokhbatolfoghahai y Downie, 2005; Vera Candiotti *et al.*, 2017), glándula de eclosión (Nokhbatolfoghahai y Downie, 2007; Cohen *et al.*, 2019), células ciliadas (Nokhbatolfoghahai *et al.*, 2005; 2006), disco oral (Thibaudeau y Altig, 1988; Hall *et al.*, 1997; Vera Candiotti *et al.*, 2011, Navarro Acosta y Vera Candiotti, 2017) y desarrollo de las branquias externas (Nokhbatolfoghahai y Downie, 2008; Grosso *et al.*, 2017).

Las especies pertenecientes a la familia Phyllomedusidae constituyen un grupo interesante para realizar estudios comparativos de ontogenia temprana debido a su peculiar biología reproductiva (características del nido, presencia de cápsulas de humedad) y la prolongada duración de esta etapa como resultado de una eclosión tardía (Faivovich *et al.*, 2010). El conocimiento que se tiene actualmente sobre la diversidad de patrones de desarrollo ontogenético de phyllomedusidos es aún limitado. Al momento de iniciar este trabajo, la ontogenia temprana solo se conocía para cinco especies dentro de esta familia: *Pithecopus azureus* (Budgett, 1899), *Pithecopus rohdei* (Lutz y Lutz, 1939), *Phyllomedusa trinitatis* (Kenny, 1968), *Agalychnis callidryas* (Warkentin, 2002) y *Agalychnis spurrelli* (Vargas y Gutiérrez, 2005).

A diferencia de la etapa embrionaria intracapsular, la etapa larval en anuros está fuertemente influenciada por el ambiente. Para su estudio se utilizan tablas estandarizadas (Gosner, 1960; Taylor y Kollros, 1946). Mediante estas tablas se identifica estadios en base a caracteres morfológicos. Sin embargo, en estudios de ontogenia es importante tener en cuenta no solo el desarrollo, relacionado a cambios en la forma, sino también el crecimiento, relacionado a cambios en el tamaño (Fabrezi *et al.*, 2017). Estudios comparativos muestran que existe una gran variabilidad interespecífica (Fabrezi, 2011) referida a ambos parámetros. Además de la variación entre especies, existe una gran variación a nivel intraespecífico, es así que podemos encontrar individuos de la misma especie que presentan diferencias en su desarrollo y crecimiento dentro de un ambiente físico determinado. Para explicar esta variación en larvas de anuros, Wilbur y Collins (1973) propusieron un modelo en el que la tasa de desarrollo y crecimiento se encuentran disociados. Sugieren que esto es causado por una ventaja evolutiva que les permite a las especies ajustar la tasa de desarrollo en respuesta a su tasa de crecimiento. Si las condiciones son favorables, las larvas disminuyen su tasa de desarrollo y metamorfosean con un mayor tamaño corporal

permitiendo un rápido crecimiento larval. Si las condiciones no son favorables, las larvas aceleran su tasa de desarrollo, metamorfosean a un tamaño mínimo requerido para cada especie y continúan creciendo en la etapa terrestre. Varios estudios experimentales se realizaron poniendo a prueba el modelo Wilbur-Collins, y reportaron que ambas tasas dependen de diversos factores ecológicos como dieta, temperatura, densidad, depredación, desecación, entre otras. Por todo lo expuesto, resulta difícil determinar la duración de la etapa larval para una especie determinada, ya que depende de numerosas variables. Sin embargo, estudios referidos a este tema, independiente de las condiciones en las que las larvas se encuentran, son importantes ya que nos dan una aproximación del rango de variación de la duración de la etapa larval. Esta información resulta útil para ser usada en estudios comparativos, y en especial en estudios de índole ecológicos. En el caso de larvas de phyllomedusidos, hasta la fecha, la mayoría de los estudios se enfocan en descripciones generales (*Phyllomedusa boliviana*, Lavilla, 1983; *Pithecopus azureus*, Cei, 1980, Schulze *et al.*, 2015), en algunos casos estas descripciones incluyen medidas morfométricas (*Pithecopus ayeaye*, Pezzuti *et al.*, 2009; *Pithecopus azureus*, Lopes Santos *et al.*, 2018) y también existen estudios eco-morfológicos que incluyen morfología interna (*Phyllomedusa sauvagii* y *Pithecopus azureus*, Vera Candioti, 2007).

Por todo lo antes mencionado, los objetivos de este capítulo son:

- Describir el desarrollo embrionario y larval de *Phyllomedusa boliviana* y *Phyllomedusa sauvagii* teniendo en cuenta un conjunto de estructuras morfológicas externas, y determinar el rango de variación en el tiempo de eclosión y de metamorfosis en condiciones controladas.
- Describir el desarrollo embrionario de otras especies de phyllomedusidos, con el fin de discutir variaciones morfológicas y ontogenéticas de interés ecológico y sistemático dentro del grupo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para describir el desarrollo embrionario se colectaron nidos de cuatro especies pertenecientes a la familia Phyllomedusidae: *Phyllomedusa boliviana* (n=4); *Phyllomedusa sauvagii* (n=6) (Fig. 2), y con fines comparativos, *Phyllomedusa tetraploidea* (n=1) y *Pithecopus azureus* (n=1). El material utilizado y sitios de colecta está detallado en la Tabla 1 del Capítulo anterior. Los nidos fueron colectados con sus respectivas hojas y trasladados al laboratorio en donde fueron colgados en la pared de recipientes que contenían agua de clorificada. Los nidos fueron mantenidos a temperatura ambiente y ciclos de luz natural. Para realizar la serie de desarrollo embrionario se extrajo un promedio de 6 huevos por cada nido cada 8–12 horas, que

fueron posteriormente fijados y conservados. En todos los nidos se registró el momento en el que se produjo la eclosión. Para categorizar el desarrollo embrionario temprano se utilizó principalmente la tabla de desarrollo normal propuesta por Kenny (1968) para *Phyllomedusa trinitatis*. Esta tabla considera 24 estadios embrionarios desde la fecundación hasta la eclosión, y difiere de la comúnmente utilizada tabla de Gosner (Gosner, 1960) por definir estos estadios en base a características propias de los embriones de Phyllomedusidae. Para el estadio 25, definido por la diferenciación del espiráculo, utilizamos la tabla de Gosner. Parte de los embriones de cada especie fueron deshidratados hasta su punto crítico y luego bañados con oro para finalmente ser analizados en microscopio electrónico de barrido.

Para estudiar el desarrollo larval de *Phyllomedusa boliviana* y *Phyllomedusa sauvagii* se colocaron a los individuos eclosionados provenientes de en mesocosmos ubicados al aire libre y cubiertos con tela mosquitera. Periódicamente se fijaron individuos a lo largo de todo el desarrollo larval, por último, se registró el momento de la metamorfosis. Para categorizar estos estadios larvales posteriores a la formación del espiráculo se usó también la tabla de desarrollo de Gosner. Todos los ejemplares fueron analizados bajo lupa y teñidos con azul de metileno para un mejor contraste de las estructuras morfológicas externas. Se tomaron fotografías con escalas de cada individuo fijado que fueron luego analizadas con el programa ImageJ para las diferentes medidas morfométricas.

RESULTADOS

Desarrollo embrionario de *Phyllomedusa boliviana* y *Phyllomedusa sauvagii*

A continuación se presenta estadios descripción detallada de los estadios embrionarios de las dos especies bajo estudio, siguiendo la propuesta de Kenny (1968). Se destacan en cursiva los caracteres empleados para definir cada estadio. Las Figuras 3–8 ilustran las características principales de los embriones de ambas especies.

Phyllomedusa boliviana

El desarrollo embrionario completo dura 8 a 9 días. Los especímenes preservados fueron asignados a 11 estadios, empezando con el estadio 12.

Estadio 12 (Fig. 3A). Diámetro = 2,3 mm. Edad: ≈ 40 horas. Gástrula tardía: el tapón vitelino todavía evidente.

Estadio 17 (Fig. 3B). Largo = 4,3 mm. Edad: \approx 64 horas. Embrión elevado por encima del saco vitelino. Invaginación del estomodeo más profunda. Arcos viscerales más definidos. *Esbozo de cola visible*.

Estadio 18 (Fig. 3C). Largo = 4,1 mm. Edad: \approx 84 horas. Pronefros algo evidentes como dos crestas largas a ambos lados del cuerpo. *Primer par de branquias evidente como dos barras cortas ubicadas por detrás de las copas ópticas*. Cola más larga (largo de la cola / largo total = 0,76) con aleta caudal rudimentaria.

Estadio 19 (Fig. 3D). Largo = 4,9 mm. Edad: 88–112 horas. *Orificios olfatorios conectados con el estomodeo a través de un surco profundo. Dos pares de branquias presentes: el primer par con filamentos primarios largos (largo del eje mayor de la branquia / largo total = 0,18) y filamentos secundarios cortos; el segundo par corto, con filamentos secundarios muy cortos*. Corazón evidente como una protuberancia por debajo de la cabeza. Tubo rectal largo y cónico. Cola con miótomos bien marcados; punta de la cola redondeada.

Estadio 20 (Fig. 3E). Largo = 5,7 mm. Edad: 97–112 horas. Orificios olfatorios separados de la boca; aparece pigmentos por primera vez en el embrión en la mitad dorsal del ojo. En la región oral comienzan a aparecer los labios superior e inferior; el labio superior angosto y con forma de arco, y el labio inferior con una profunda fisura media. Melanóforos dispersos en la cabeza. *Primer y segundo par de branquias más largas (largo del eje mayor de la branquia primaria / largo total = 0,25), con filamentos secundarios muy largos y finos*. Cola larga (largo de la cola / largo total = 0,79).

Estadio 21 (Fig. 3F). Largo = 6,6 mm. Edad: 110–136 horas. Ojos con pigmento negro sólido y fisura de la coroides. Cabeza y superficie dorsal del saco vitelino con melanóforos dispersos. Rudimento del pliegue opercular. Células de la glándula de eclosión visibles en la región rostral. Por el tamaño pequeño, presencia temprana, y distribución amplia, interpretamos estas células como correspondientes al tipo temprano (early HGCs) de Cohen *et al.* (2019).

Estadio 22 (Fig. 3G). Largo = 7,0 mm. Edad: 133–152 horas. Mayor concentración de melanóforos en la cabeza y superficie dorsal del vitelo, que se empiezan a concentrar alrededor de las narinas. *Pliegues operculares no fusionados medialmente*. Labios y vainas mandibulares (rostridentes) inferior y superior presentes en el disco oral (Fig. 4A). Pulmones visibles por transparencia, por detrás de los ojos. Gran desarrollo de las branquias (largo del eje mayor de la branquia primaria / largo total = 0,25). Cola larga (largo de la cola / largo total = 0,81) curvada alrededor del embrión, con aletas más altas.

Estadio 23 (Fig. 3H). Largo = 8,3 mm. Edad: 126–160 horas. Embrión todavía curvado alrededor del vitelo. Región rostral más larga, con disco oral protuberante en

vista lateral. Melanóforos dispersos en todo el cuerpo exceptuando la superficie ventral, y muy concentrados alrededor de las narinas. En el disco oral, labios más prominentes, elevados por encima de la superficie oral; pliegues labiales A1, P1 y P2 definidos; regiones comisurales prominentes y esbozan papilas marginales. Fisura de la coroides evidente como una pequeña muesca. *Pliegues operculares medialmente fusionados*. Branquias largas (largo del eje mayor de la branquia primaria / largo total = 0,21). Cola más larga (largo de la cola / largo total = 0,84), con aletas altas.

Estadio 24 (Fig. 3I-J). Largo = 9,7 mm. Edad: 144–224 horas. Embriones con la capacidad de eclosionar. El vitelo comienza a reducirse. Máxima concentración de melanóforos en la cabeza. Disco oral con vainas mandibulares (Fig. 4B) y dos papilas marginales al final de cada labio inferior y superior (Fig. 4C); más adelante, papilas adicionales aparecen en el labio inferior y la hilera A2 aparece como dos segmentos cortos por debajo del final de la hilera A1 (Fig. 4C); una corta hilera P3 se diferencia en la región media (Fig. 4D); hacia el final del estadio se esbozan dientes labiales en las hileras A1, P1 y P2, y en el margen papilar persiste un claro ventral corto (Fig. 4E). Glándula de eclosión aún presente como células con microvellosidades dispuestas entre células epiteliales, en el área que rodea el disco oral y narinas (Fig. 5A-C). Sin fisura de la coroides. Pliegues operculares cubriendo la base de cada branquia; margen posterior de los pliegues operculares libre y engrosado. *Branquias reduciéndose hasta ser cubiertas completamente por el pliegue opercular*. Cola larga (largo de la cola / largo total = 0,80), con aletas altas. Órgano pineal visible como una mancha no pigmentada anterior a los ojos. Surcos sensoriales más definidos con neuromastos que aparecen al final de esta etapa (Fig. 5D-F). Corazón visible por transparencia anterior a la abertura del espiráculo. Cuando eclosionan y están en el agua, los melanóforos muy concentrados en todo el cuerpo (Fig. 3J), cubriendo casi todo el vitelo.

Estadio 25 (Fig. 3K). Largo = 15,1 mm. Edad: 230–851 horas. *Espiráculo medio formado*. Cola larga (largo de la cola / largo total = 0,75). Glándulas de eclosión aún visibles. Más adelante en esta etapa aparecen dientes labiales en la hilera A2 y las vainas mandibulares desarrollan un borde aserrado (Fig. 4F).

Phyllomedusa sauvagii

El desarrollo embrionario completo dura de 7 a 8 días, los especímenes preservados fueron asignados a 12 estadios, empezando con el estadio 12.

Estadio 12. Diámetro = 2,3 mm. Edad: ≈ 35 horas. Gástrula tardía: el tapón vitelino todavía es evidente.

Estadio 15 (Fig. 6A). Diámetro = 2,4 mm. Edad: \approx 50 horas. Huevos con mucho vitelo y embrión que sobresale del saco vitelino. *Pliegues neurales engrosados anteriormente y fusionados desde las vesículas ópticas hasta superar la longitud media del embrión.* Invaginación superficial del estomodeo.

Estadio 16 (Fig. 6B). Diámetro = 2,4 mm. Edad: \approx 50 horas. Embrión por encima del saco vitelino. *Pliegues neurales fusionados excepto por una pequeña porción posterior.* Vesículas ópticas bien definidas. Arcos viscerales bien evidentes que se observan como pronunciadas crestas ubicadas por debajo de la región anterior de los pliegues neurales. Invaginación superficial del estomodeo e invaginación del proctodeo con tubo rectal rudimentario visible.

Estadio 17 (Fig. 6C). Largo = 3,3 mm. Edad: \approx 58 horas. Embrión elevado por encima del saco vitelino. Invaginación del estomodeo más profunda. Arcos viscerales más definidos. Vesículas ópticas bien definidas con indentación central. *Esbozo de cola visible.*

Estadio 18. (Fig. 6D). Largo = 3,6 mm. Edad: \approx 58 horas. Pronefros evidentes como dos crestas largas a ambos lados del cuerpo. *Primer par de branquias evidente como dos barras cortas ubicadas por detrás de las copas ópticas.* Cola más larga (largo de la cola / largo total = 0,75) con aleta caudal rudimentaria.

Estadio 19 (Fig. 6E). Largo = 4,7 mm. Edad: 41–69 horas. *Orificios olfatorios conectados con el estomodeo a través de un surco profundo.* Glándulas adhesivas por primera vez visibles como dos protuberancias redondeadas ventrales al estomodeo. *Dos pares de branquias presentes: el primer par con filamentos primarios largos (largo del eje mayor de la branquia / largo total = 0,21) y filamentos secundarios cortos; el segundo par corto, con filamentos secundarios muy cortos.* Corazón evidente como una protuberancia por debajo de la cabeza. Tubo rectal largo y cónico. Cola más larga (largo de la cola / largo total = 0,70) con miótomos bien marcados y aleta ventral casi dos veces más profunda que la aleta dorsal; punta de la cola redondeada.

Estadio 21 (Fig. 6F). Largo = 5,3 mm. Edad: 82–91 horas. Cabeza con melanóforos dispersos. Orificios olfatorios no conectados con el estomodeo. En la región oral comienzan a aparecer los labios superior e inferior; el labio superior angosto y con forma de arco, y el labio inferior con una profunda indentación media (Fig. 7A). Glándulas adhesivas presentes (Fig. 7A–D). Ojos con la mitad dorsal pigmentada y fisura de la coroides; posteriormente, ojos con pigmento negro. Pliegues operculares por primera vez evidentes en la base de cada branquia. *Primer y segundo par de branquias más largas (largo del eje mayor de la branquia primaria / largo total = 0,28), con filamentos secundarios muy largos y finos; filamentos de las branquias*

cubiertos con filas densas de largas ciliis. Cola larga (largo de la cola / largo total = 0,72), con aleta translúcida y punta redondeada.

Estadio 22 (Fig. 6G). Largo = 5,9 mm. Edad: 90–108 horas. Embrión todavía curvado alrededor del vitelo. Región rostral corta y redondeada en vista lateral. Cabeza y superficie dorsal del saco vitelino con melanóforos dispersos. Órgano pineal visible como una mancha no pigmentada anterior a los ojos. Vainas mandibulares inferior y superior presentes en el disco oral; labio superior prominente y labio inferior grueso con una indentación media (correspondiente al espacio en la hilera P1) y se esboza un surco transversal, dividiendo en dos mitades (correspondiente al espacio en la hilera P2) (Fig. 7B). Glándulas adhesivas con forma cónica, en su máximo desarrollo, con la región central algo deprimida en el ápice. (Fig. 7B). Células de la glándula de eclosión visibles en la región rostral. Por el tamaño pequeño, presencia temprana, y distribución amplia, interpretamos estas células como correspondientes al tipo temprano (early HGCs) de Cohen *et al.* (2019). Ojos con pigmento negro con fisura de la coroides. *Pliegues operculares no fusionados medialmente*. Branquias largas (largo del eje mayor de la branquia primaria / largo total = 0,25). Pulmones visibles por transparencia, por detrás de los ojos. Cola larga (largo de la cola / largo total = 0,73) curvada alrededor del embrión, con aletas más altas. Surcos sensoriales (primordios de las líneas laterales) por primera vez evidentes alrededor de la región oral (Fig. 8B).

Estadio 23 (Fig. 6H). Largo = 8,7 mm. Edad: 108–154 horas. Embrión todavía curvado alrededor del vitelo. Región rostral más larga, con disco oral protuberante en vista lateral. Melanóforos dispersos en todo el cuerpo, exceptuando la superficie ventral. En el disco oral, labio más prominente, elevado por encima de la superficie oral; indentación media más marcada en el labio inferior e hilera P2 bien definida; más tarde en esta etapa, regiones comisurales prominentes y esbozan grandes papilas marginales. Glándulas adhesivas en regresión. Fisura de la coroides evidente. *Pliegues operculares medialmente fusionados*. Branquias largas (largo del eje mayor de la branquia primaria / largo total = 0,25). Cola larga (largo de la cola / largo total = 0,70), con aletas altas.

Estadio 24 (Figs. 6I-K). Largo = 6,7 mm. Edad: 114–181 horas. Embriones eclosionados. Vitelo reducido. Disco oral con vainas mandibulares aserradas y dos papilas marginales al final de cada labio inferior y superior; fila A1, P1 y P2 definidas; más adelante, más papilas aparecen en el labio inferior y superior y una corta hilera P3 se diferencia en la región media (Fig. 7C); la hilera A2 aparece como dos segmentos cortos por debajo del final de la hilera A1 (Fig. 7D). Glándulas adhesivas en regresión y tomando una disposición anterolateral al disco hasta que finalmente

desaparecen. Fisura de la coroides todavía notable. Pliegues operculares cubriendo la base de cada branquia; margen posterior del pliegue opercular libre y engrosado (Figs. 6J-K y 8C). *Branquias reduciéndose hasta ser cubiertas completamente por el pliegue opercular*; ciliación de las branquias todavía abundante (Figs. 8C y 8D). Cola larga (largo de la cola / largo total = 0,70), con aletas altas. Líneas laterales más definidas: angular, oral, supraorbital, infraorbital, y presumiblemente oral longitudinal (*sensu* Lannoo, 1999) son identificables (Figs. 8C y 8E). Nuestras imágenes no son conclusivas respecto de la presencia y distribución de las células de la glándula de eclosión. Sin embargo, la presencia del puntillado característico de las células tipo temprano en este estadio (Fig. 8E), sumada a la evidencia en otras especies, nos permite suponer que esta estructura está presente desde estadios anteriores.

Estadio 25. Largo = 10,2 mm. Edad: 178–683 horas. Disco oral con papilas marginales del labio inferior creciendo medialmente con un pequeño espacio ventral remanente, y dientes labiales en hileras A1, P1 y P2 (Fig. 7E); más adelante en esta etapa, papilas marginales del labio inferior completas y dientes labiales emergen en las hileras P3 y A2 (Fig. 7F). *Espiráculo medio formado*. Glándulas adhesivas continúan en regresión. Corazón visible por transparencia anterior a la abertura del espiráculo. Cola larga (largo de la cola / largo total = 0,70).

Estadio 26 (Fig. 6L). Largo = 23,6 mm. Edad: 329–683 horas. Dientes labiales más numerosos, con morfología definida: largos, estrechos y rectos con cabeza recta y cúspides muy cortas. Desaparecen las glándulas adhesivas. Tubo del espiráculo más largo. Cola larga (largo de la cola / largo total = 0,67). Neuromastos desarrollados en líneas laterales (Fig. 8F).

Variación temporal del desarrollo embrionario

Cuando se analizó el momento en el que se registra cada estadio a lo largo del desarrollo embrionario para cada nido (*P. boliviana* n=4; *P. sauvagii* n=6) se observó una gran variación temporal (Fig. 9). A pesar de estas diferencias, que se dan al comienzo del desarrollo embrionario, los embriones siempre se encuentran en el estadio 24 al llegar al momento de la eclosión. Por otra parte, esta variación no se registra a nivel intra-nido, es decir, el desarrollo de los embriones está sincronizado dentro de cada nido.

Etapa larval de *Phyllomedusa boliviana* y *Phyllomedusa sauvagii*

La etapa larval de *P. boliviana* dura alrededor 153 días mientras que la de *P. sauvagii* alrededor de 112 días (Fig. 10). En las Tablas 1 y 2 se resumen las diferentes

medidas morfométricas tomadas para los estadios de desarrollos registrados para las dos especies.

Las variables desarrollo (progresión de estadios) y crecimiento (incremento de longitud) en larvas de ambas especies se comportan de manera similar (Fig. 10). Al comienzo de la etapa larval, tanto el desarrollo como el crecimiento se estancan, las larvas pasan varios días en el estadio 25 y con tamaño similar al que eclosionaron. Después de varias semanas, recién comienza un aumento sostenido en la longitud total y en el estadio en que se encuentran. Comparando ambas especies, encontramos que este aumento en el crecimiento y el desarrollo en las larvas de *P. sauvagii* comienza varios días antes y se da de manera más acelerada. En consecuencia, las larvas de *P. sauvagii* alcanzan un tamaño y desarrollo similar a las de *P. boliviana* en un período de tiempo menor dando como resultado una disminución en la duración de la etapa larval.

Desarrollo embrionario en otras especies de phyllomedusidos

Phyllomedusa tetraploidea

Estadio 17. (Fig. 11A). Largo = 3,9 mm. Invaginación del estomodeo. Esbozo de la cola visible; el cuerpo de embrión visiblemente elevado por encima del saco vitelino; los pronefros como crestas alargadas a cada lado del cuerpo. Los rudimentos branquiales aparecen como dos barras cortas que se proyectan lateralmente por debajo y por detrás de las copas ópticas. Presenta células ciliadas en todo el cuerpo, concentradas mayormente a la altura del saco vitelino.

Estadio 18. (Fig. 11B). Largo = 3,9 mm. Invaginación del estomodeo más profunda. Rudimento de la aleta caudal, las vesículas ópticas bien formadas con muescas centrales. Miótomos en la cola. Rudimentos branquiales. El margen de las invaginaciones del proctodeo se engrosan formando rudimentos del tubo rectal. Corazón apenas visible como una protuberancia por debajo de la cabeza y encima del saco vitelino.

Estadio 19. (Fig. 11C). Largo = 4,7 mm. Dos pares de branquias presentes: el primer par con filamentos primarios largos (largo del eje mayor de la branquia / largo total = 0,27) y filamentos secundarios cortos; el segundo par corto, con filamentos secundarios muy cortos. Cola más larga (largo de la cola / largo total = 0,78). El corazón muy evidente aparece como una protuberancia por debajo de la cabeza y por encima del saco vitelino. Evaginación del proctodeo. Labio superior e inferior hendido. Estomodeo con forma de diamante (Fig. 12A).

Estadio 19-20. (Fig. 11D). Largo = 5,4 mm. Orificios olfatorios separados de la boca; aparece pigmentos por primera vez en el embrión en la mitad dorsal del ojo;

branquias con filamentos prominentes (largo del eje mayor de la branquia / largo total = 0,39). Cola larga (largo de la cola / largo total = 0,71). Glándulas adhesivas por primera vez visibles como dos estructuras redondeadas ventrales al estomodeo. En la región oral desaparece hendidura del labio inferior (Fig. 12B). Ciliación en todo el cuerpo. Tubo rectal largo y cónico. Se observan por primera vez las glándulas de eclosión representadas por células con microvellosidades en la región oral.

Estadio 20. (Fig. 11E). Largo = 6,4 mm. Desarrollo de los filamentos branquiales (largo del eje mayor de la branquia / largo total = 0,32). Aparecen melanóforos dispersos en la cabeza. Pigmentación sólida en el ojo, en la superficie dorsal. Tubo proctodeal presente. Cola larga (largo de la cola / largo total = 0,81). Glándulas adhesivas posterior y lateral al estomodeo. Estomodeo alargado transversalmente (Fig. 12C).

Estadio 21. (Fig. 11F). Largo = 7,3 mm. Desarrollo de los filamentos branquiales (largo del eje mayor de la branquia / largo total = 0,33). Ojos con pigmento negro sólido; márgenes del iris y fisura de la coroides pronunciado; Melanóforos en la cabeza y superficie dorsal del saco vitelino. Cola larga (largo de la cola / largo total = 0,83). Rudimento del pliegue opercular. Glándula adhesiva en su máximo desarrollo. Se observa desarrollo de los labios (Fig. 12D). Pequeñas células de la glándula de eclosión están inequívocamente presentes a partir de este estadio (Figs. 14A–C).

Estadio 22. (Fig. 11G). Largo = 8,1 mm. Mayor desarrollo de los filamentos branquiales (largo del eje mayor de la branquia / largo total = 0,43). Cola larga (largo de la cola / largo total = 0,81). Ojos con pigmento negro con fisura de la coroides. Corazón parcialmente cubierto por pliegues operculares no fusionados medialmente. Melanóforos muy dispersos en todo el cuerpo, exceptuando la superficie ventral. Glándulas adhesivas menos desarrolladas redondeadas y laterales al estomodeo. Vainas mandibulares superior e inferior sin el borde dentado (Fig. 12E).

Estadio 23. (Fig. 11H). Largo = 9,0 mm. Corazón completamente cubierto por orificios operculares que se encuentran y fusionan medialmente; mayor concentración de melanóforos. Branquias largas (largo del eje mayor de la branquia primaria / largo total = 0,42). Cola larga (largo de la cola / largo total = 0,80). Glándulas adhesivas comienzan a regresar, se ubican laterales y anterior al estomodeo, como dos estructuras alargadas y cortas. En el disco oral, labio más prominente, elevado por encima de la superficie oral. Vainas superior e inferior bien definidas. Esbozos de papilas marginales en las regiones comisurales. Se esboza hilera A1, P1, P2 y P3 (Fig. 12F). Más tarde en este estadio (Fig. 11I), mayor concentración de melanóforos en todo el cuerpo, excepto en la porción ventral del saco vitelino. Sin fisura de la coroides. Glándulas adhesivas continúan en regresión, laterales y anterior al

estomodeo. Pulmones visibles por transparencia, por detrás de los ojos. Se alargan las hileras A1, P2 y P3. Papilas marginales más desarrolladas (Fig. 12G). Branquias largas (largo del eje mayor de la branquia primaria / largo total = 0,26). Cola larga (largo de la cola / largo total = 0,84).

Estadio 24. (Figs. 14J-K). Largo = 12,5 mm. Embriones con la capacidad de eclosionar. Vitelo reducido. En el disco oral, más papilas aparecen en el labio inferior y superior (Fig. 12H). Pliegues operculares cubriendo la base de cada branquia; margen posterior del pliegue opercular libre y engrosado. Branquias reduciéndose hasta ser cubiertas completamente por el pliegue opercular (largo del eje mayor de la branquia primaria / largo total = 0,17). Cola larga (largo de la cola / largo total = 0,82), no curvada alrededor del embrión, con aletas altas. Branquias con gran concentración de células ciliadas. Glándulas adhesivas continúan en regresión. Glándula de eclosión todavía visible. Líneas laterales con neuromastos desarrollados.

Estadio 25. (Fig. 11L). Largo = 18,0 mm. Branquias desaparecen, cubiertas completamente por el pliegue opercular. Desaparecen las glándulas adhesivas y de eclosión. En el disco oral, vainas mandibulares con bordes dentados afilados, papilas marginales y submarginales, y dientes labiales en hileras A1, P1 y P2; en el margen papilar inferior persiste un claro ventral pequeño (Figs. 12I y 13A-C). Cola larga (largo de la cola / largo total = 0,75).

Pithecopus azureus

Los especímenes preservados fueron asignados sólo a 7 estadios, debido a que carecemos de etapas anteriores al estadio 19.

Estadio 19 (Fig. 15A). Largo = 4,4 mm. Orificios olfatorios conectados con el estomodeo a través de un surco profundo. Estomodeo con forma de diamante. Glándulas adhesivas visibles como dos estructuras separadas, largas y oblongas, posterior y lateral al estomodeo. Dos pares de branquias presentes: el primer par con largos filamentos primarios y filamentos secundarios cortos; el segundo par muy corto, con forma de barra, sin filamentos secundarios. Corazón evidente como una protuberancia por debajo de la cabeza. Tubo rectal largo y cónico. Cola tan larga como el cuerpo (largo de la cola / largo total = 0,5) con miótomos bien marcados y aleta ventral más profunda que la dorsal; punta de la cola redondeada.

Estadio 21 (Figs. 15B y 15C). Largo = 5,5 mm. Embrión con saco vitelino voluminoso y altamente vascularizado. Sin melanóforos. Orificios olfatorios no conectados al estomodeo. El disco oral comienza a formarse: esbozan los labios superior e inferior con muchas cilias; el labio superior angosto y con forma de arco y el labio inferior presenta una indentación media profunda; vainas mandibulares inferior y

superior comienzan a diferenciarse (Fig. 16A). Ojos con coloración difusa, concentrada en la mitad dorsal. Pliegues operculares por primera vez visibles al final de esta etapa. Primer y segundo par de branquias largas (largo del eje mayor de la branquia primaria / largo total = 0,27), con filamentos secundarios muy largos y delgados; un espécimen con desarrollo desigual de las branquias: la branquia izquierda muy corta y la derecha con la branquia primaria ramificada y branquia secundaria más corta. Cola larga (largo de la cola / largo total = 0,72) con aleta translúcida, la aleta ventral el doble de profunda que la aleta dorsal; punta de la cola redondeada.

Estadio 22 (Fig. 15D). Largo = 7,6 mm. Cabeza con melanóforos dispersos. Vainas mandibulares superior e inferior sin el borde dentado; labio superior prominente, con dos papilas marginales desarrollándose en cada extremo, y labio inferior grueso con un surco medio poco profundo, correspondiente al espacio en la hilera P1. Glándulas adhesivas alcanzan su máximo desarrollo, casi continuas ventralmente, formando una estructura con forma de herradura alrededor del disco oral (Fig. 16B). Neuromastos desarrollados son evidentes en las líneas laterales orales. Ojos con pigmento negro sólido y fisura del coroides evidente. Pliegues operculares no fusionados medialmente. Branquias largas (largo del eje mayor de la branquia primaria / largo total = 0,30). Cola larga (largo de la cola / largo total = 0,72) curvada alrededor del embrión, ocultando el disco oral.

Estadio 23 (Fig. 15E). Largo = 8,2 mm. Embrión curvado alrededor del saco vitelino; algunos embriones eclosionados. Cabeza y superficie dorsal del saco vitelino con melanóforos dispersos. Órgano pineal visible como una mancha no pigmentada anterior a los ojos. Labio inferior del disco oral sin cilias; papilas marginales desarrollándose en cada extremo y pliegue prominente transversal correspondiente a la hilera P2; más adelante, labio superior sin cilias y pliegues labiales inferiores P1 y P2 más definidas. Al comienzo de la etapa glándulas adhesivas en su máximo desarrollo (Fig. 16C), y al final comienza a regresar (Fig. 16D). En la región dorsal al labio superior se evidencian células de gran tamaño, presumiblemente correspondientes a las células de eclosión tardías descritas por Cohen *et al.* (2019). Fisura de la coroides evidente como una pequeña muesca. Pliegues operculares medialmente fusionados, con margen posterior algo engrosado. Branquias largas (largo del eje mayor de la branquia primaria / largo total = 0,20). Cola larga (largo de la cola / largo total = 0,71) curvada alrededor del embrión. De manera similar a la especie anterior, nuestras imágenes no son conclusivas respecto de la presencia y distribución de las células de la glándula de eclosión. Sin embargo, la presencia del puntillado característico de las células tipo temprano, y de células de gran tamaño en la región

dorsal del rostro, sumada a la evidencia en otras especies, nos permite suponer que esta estructura está presente.

Estadio 24 (Figs. 15F–H). Largo = 9,9 mm. Embriones eclosionados. Vitelo reducido. Melanóforos dispersos en la cabeza, la superficie dorsal del saco vitelino y la cola. Disco oral más desarrollado y ancho: vainas mandibulares con bordes dentados afilados; labio superior con grandes papilas marginales en los extremos y en las regiones comisurales; hilera A2 presente como dos segmentos cortos por debajo de los extremos de la hilera A1; labio inferior con papilas marginales completas e hilera P3 muy corta apareciendo en la región media (Fig. 16E); dientes labiales por primera vez evidentes en la hilera P1, luego en la P2 y A1; los dientes labiales emergen frecuentemente en dirección media a lateral dentro de cada hilera y su morfología cambia a lo largo del desarrollo, siendo el primer diente en aparecer simple, muy corto sin cúspide (Figs. 17A y 17B). Glándulas adhesivas reducidas. Fisura de la coroides evidente. Pliegues operculares cubriendo la base de cada branquia; margen posterior de los pliegues operculares libre y engrosado. Branquias reducidas hasta estar completamente cubierta por el pliegue opercular. Cola larga (largo de la cola / largo total = 0,74) no curvada alrededor del embrión, punta de la cola redondeada.

Estadio 25 (Fig. 15I). Largo = 11,2 mm. Melanóforos aparecen en la superficie ventro-lateral de la región abdominal. Glándulas adhesivas muy reducidas, pero todavía evidentes. Espiráculo medio formado. Corazón visible por transparencia anterior a la abertura del espiráculo. Cola larga (largo de la cola / largo total = 0,73).

Estadio 27. Largo = 13,9 mm. Dientes labiales en la hilera A2 y P3 y papilas submarginales en la región comisural (Fig. 16F); dientes labiales más numerosos con morfología definida: cortos, anchos y rectos con cabeza corta y recta y con cúspides muy cortas (Fig. 17C); más adelante, papilas marginales se vuelven más pequeñas y más numerosas y dispuestas aparentemente en series dobles. Cola larga (largo de la cola / largo total = 0,71). Desaparecen las glándulas adhesivas.

DISCUSIÓN

La discusión de estos resultados se presenta de manera integrada con las siguientes, en el Capítulo 5.

FIGURAS Y TABLAS

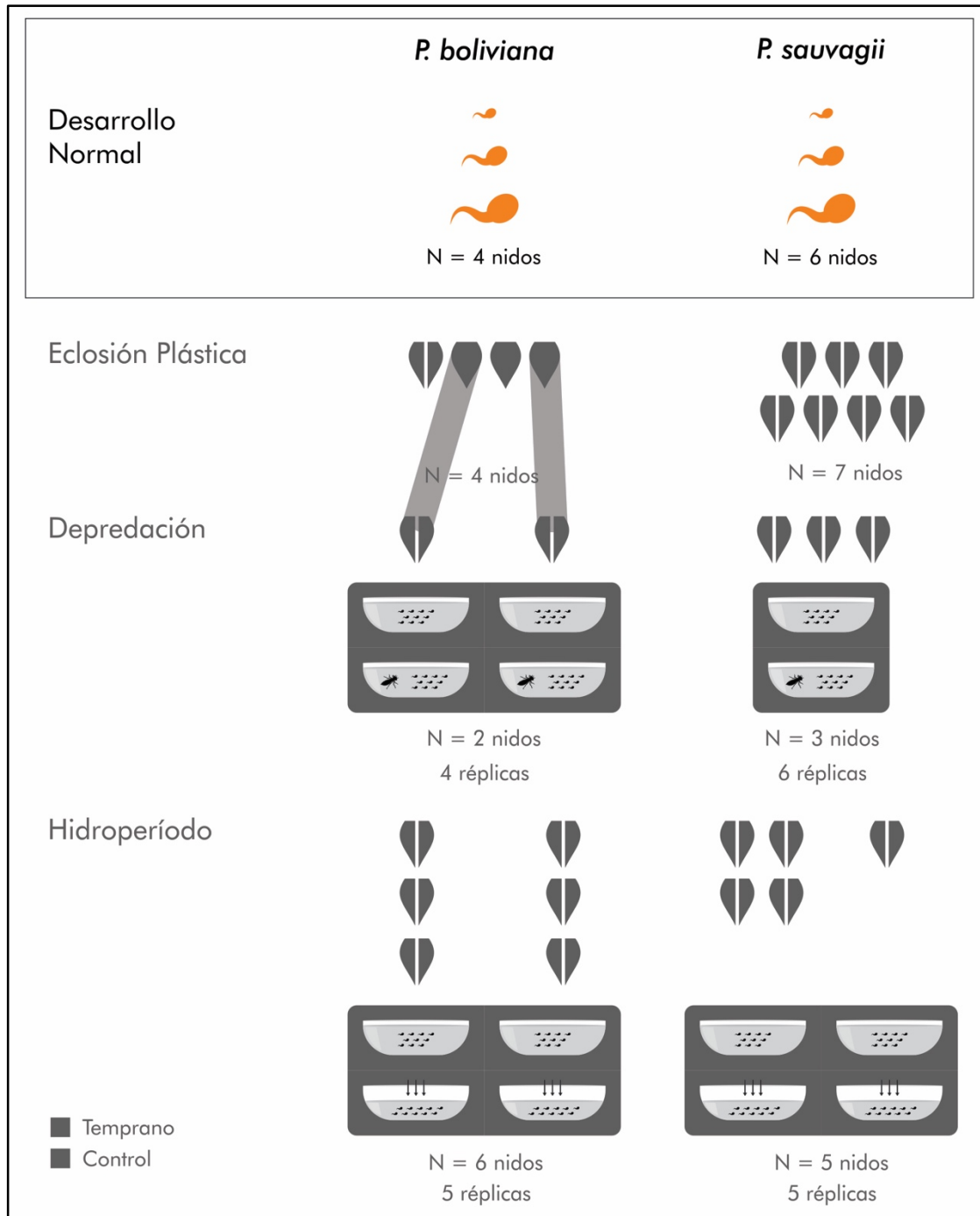


Figura 2. Resumen material y métodos empleados en este Capítulo, enfatizado en el esquema general. La descripción detallada de estadios embrionarios se realizó sobre 4 nidos de *P. boliviana* y 6 nidos de *P. sauvagii*. La etapa larval se describió con individuos de 3 nidos de *P. boliviana* y 5 nidos de *P. sauvagii* que corresponden a nidos control de los experimentos siguientes.

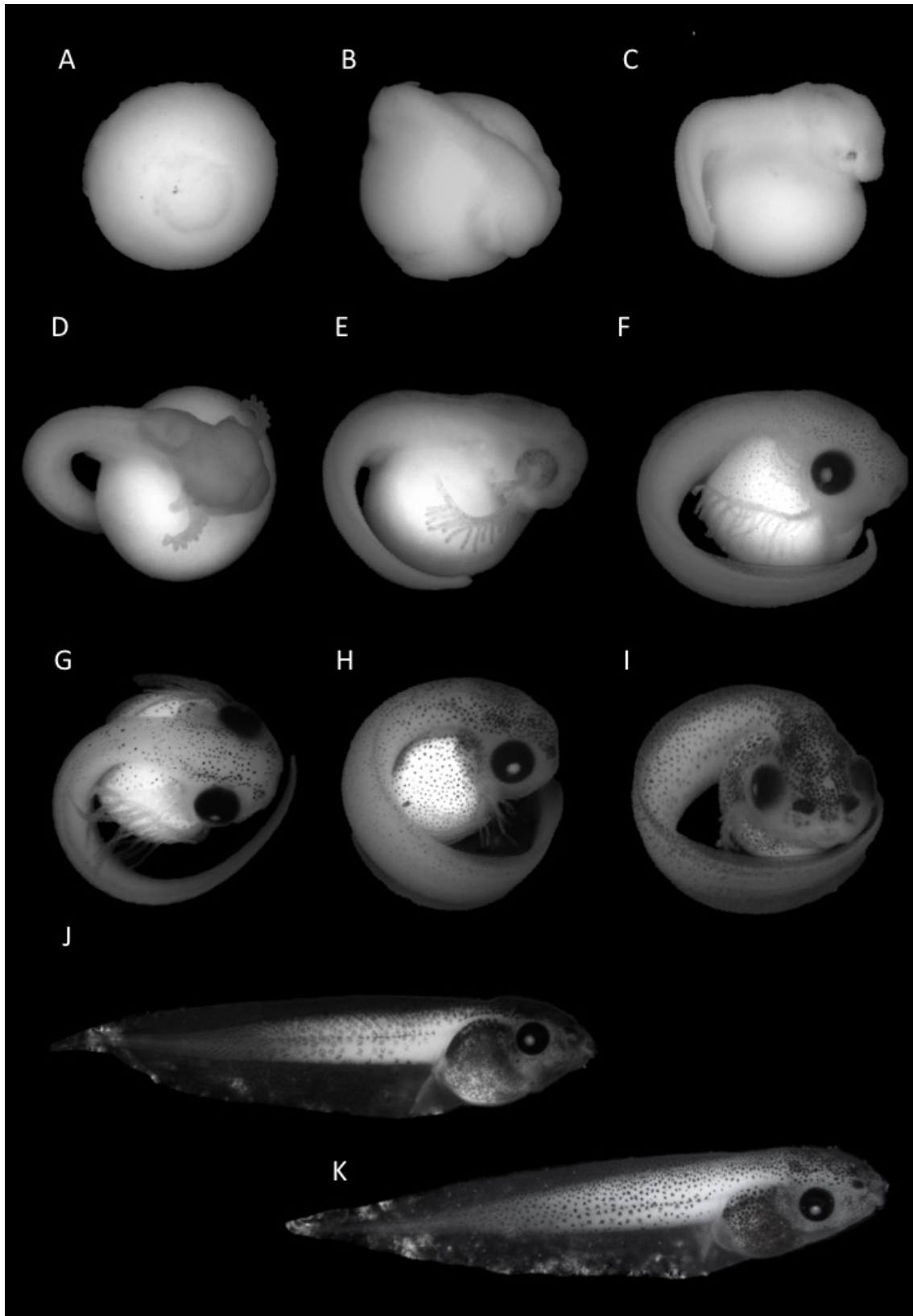


Figura 3. Serie de desarrollo de *Phyllomedusa boliviana*. A. Estadio 12; B. Estadio 17; C. Estadio 18; D. Estadio 19; E. Estadio 20; F. Estadio 21; G. Estadio 22; H. Estadio 23; I. Estadio 24; J. Estadio 24+, embriones en el agua; K. Estadio 25.

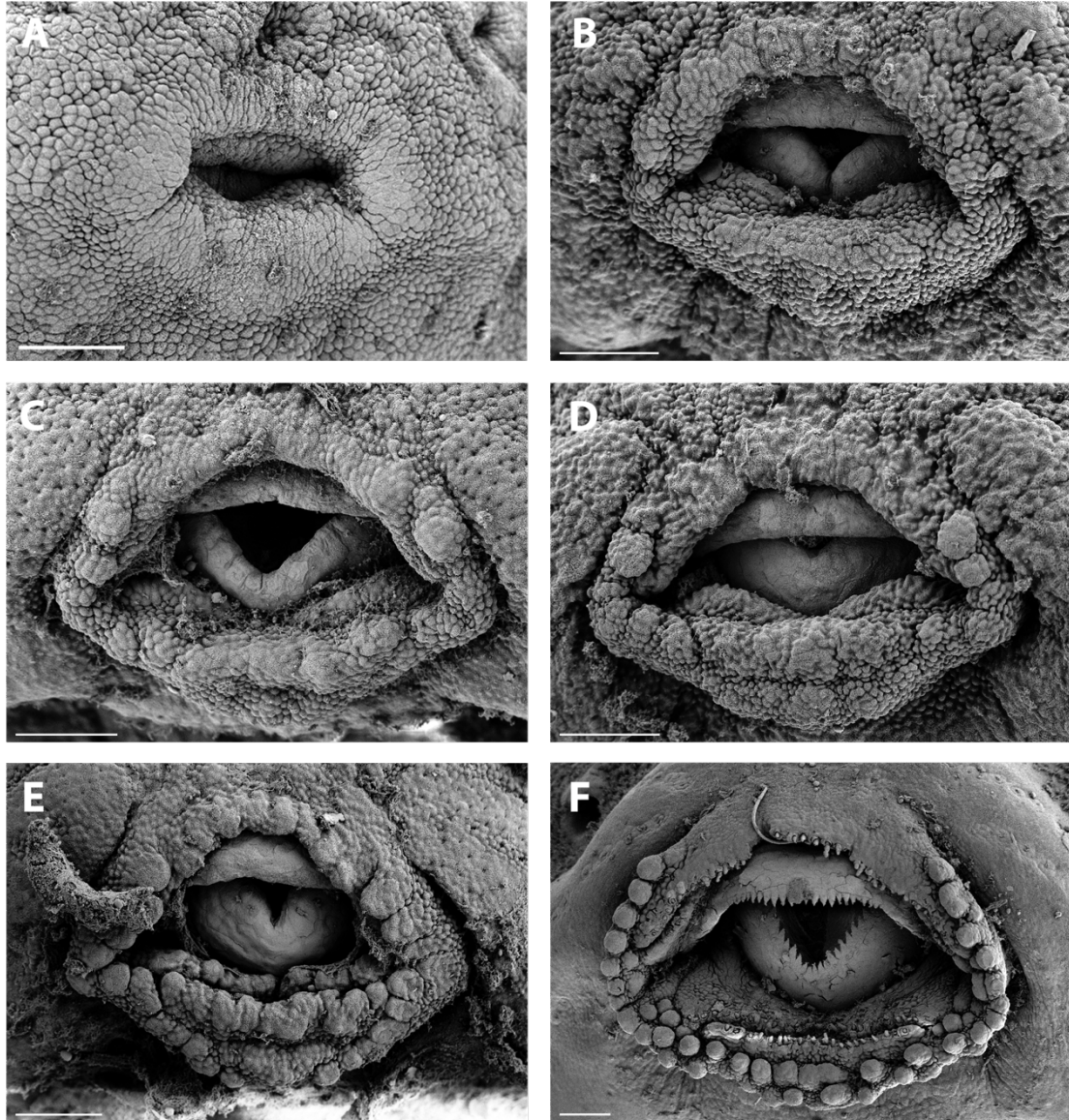


Figura 4. Desarrollo del disco oral en vista frontal de embriones de *Phyllomedusa boliviana*. A. Estadio 22, labio superior e inferior; B. Estadio 24, hilera A1, P1 y P2 definidas; C. Estadio 24+, fila A2 desarrollándose; D. Estadio 24++, papilas más definidas; E. Estadio 24+++, mostrando papilas marginales inferiores casi completas e hilera P3 definida F. Estadio 25, vainas mandibulares aserradas y dientes labiales en todas las filas excepto P3. Escalas: 100 µm.

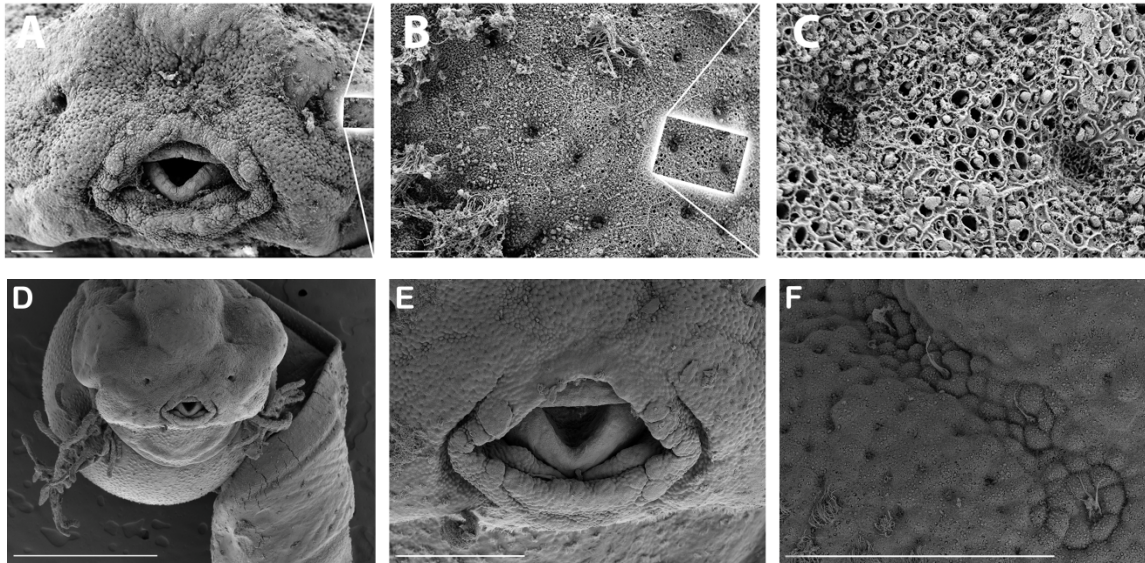


Figura 5. Microscopía electrónica de barrido de embriones de *Phyllomedusa boliviana*. A. Estadio 24+, vista frontal en donde se observa el disco oral y se resalta un área con células de la glándula de eclosión; B. Detalle del área en mayor magnificación; C. Detalle de las células secretoras con microvellosidades; D. Embrión más avanzado en el estadio, con líneas laterales orales en desarrollo; E. Detalle de la región oral; F. Detalle de las células de eclosión y neuromastos desarrollados. Escalas = A 100 μm ; B-C 10 μm ; D 1 mm; E-F 100 μm .

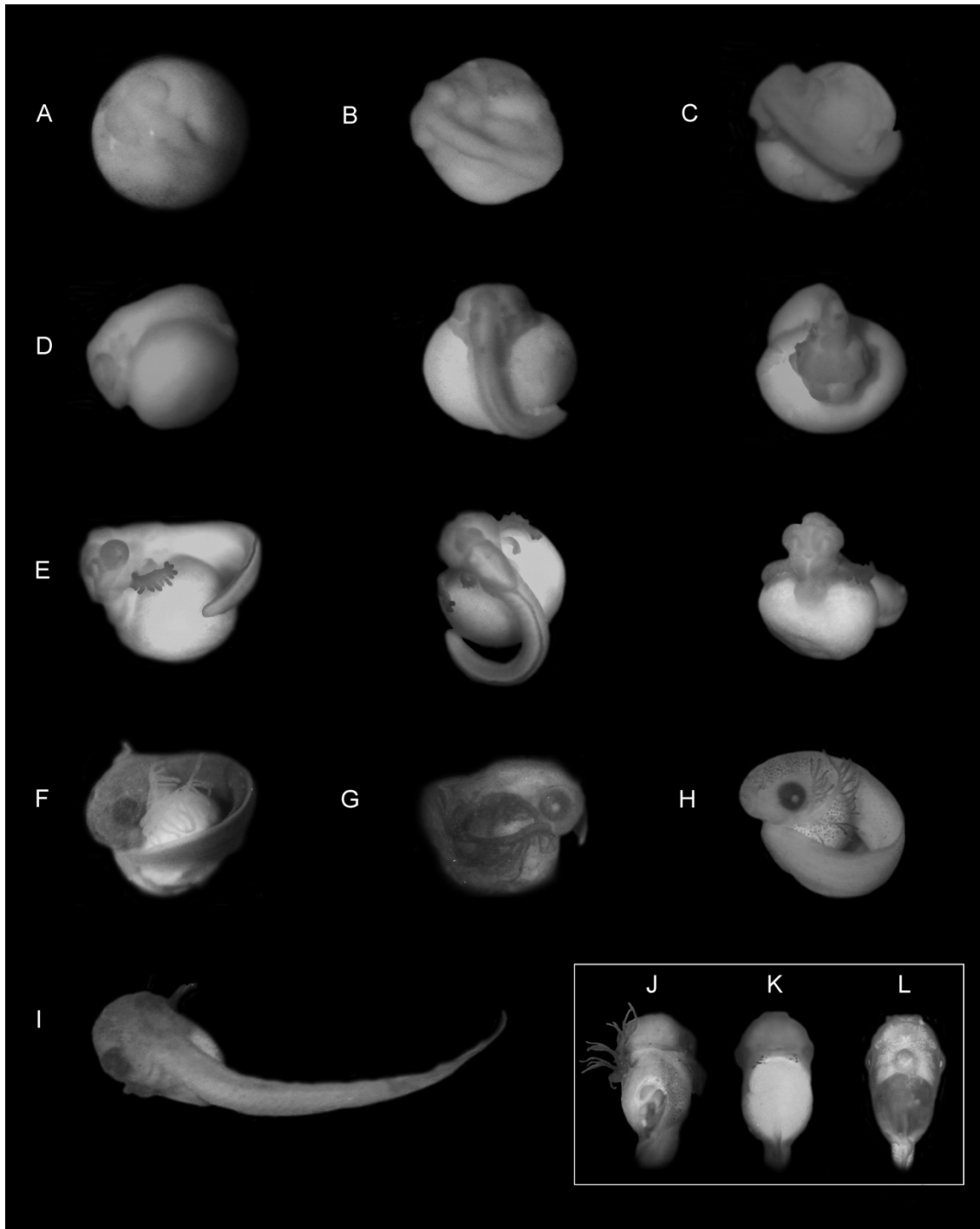


Figura 6. Serie de desarrollo de *Phyllomedusa sauvagii*. A. Estadio 15; B. Estadio 16; C. Estadio 17; D. Estadio 18; E. Estadio 19; F. Estadio 21; G. Estadio 22; H. Estadio 23; I. Estadio 24; J–K. Estadio 24; L. Estadio 26.

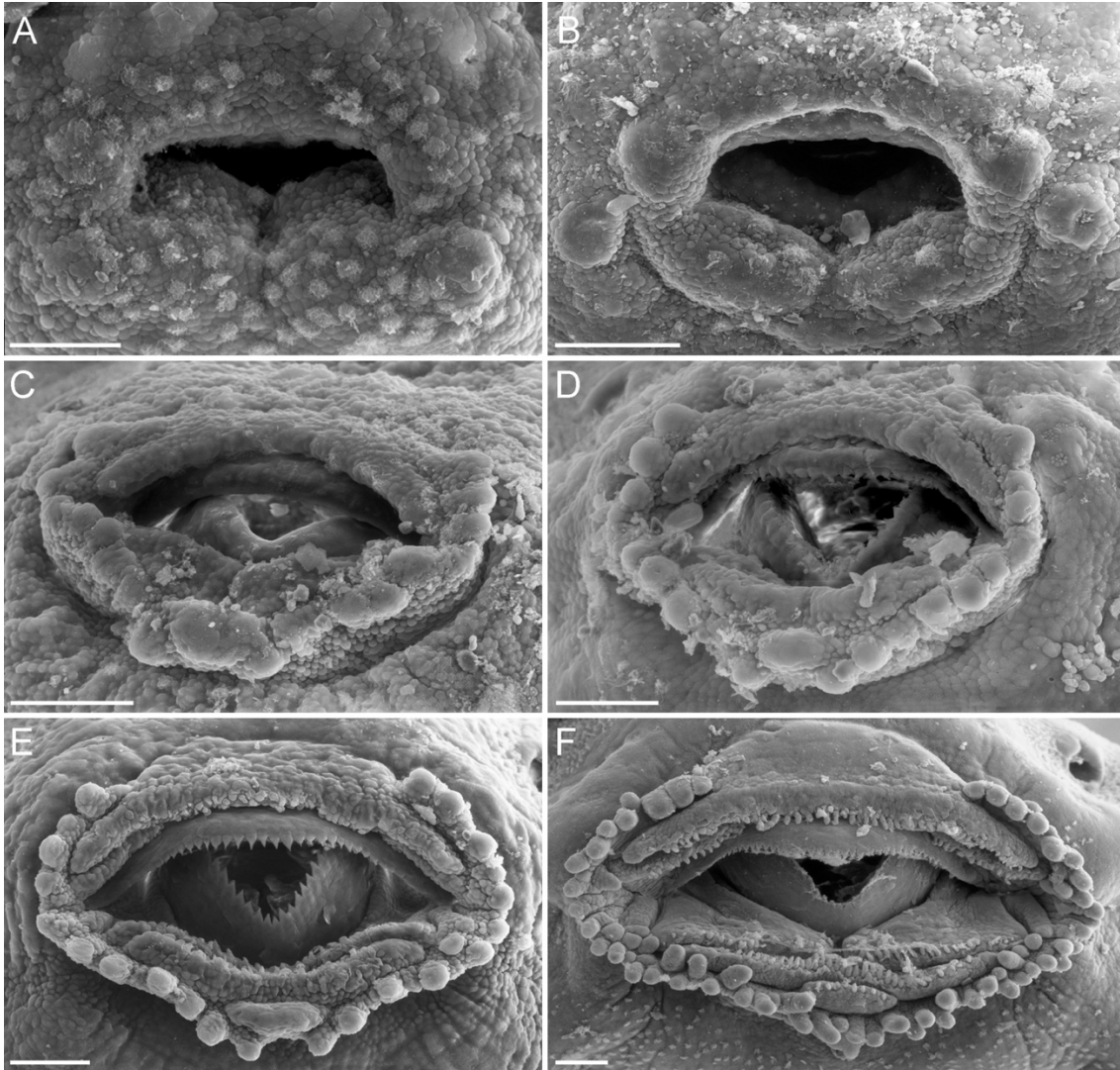


Figura 7. Desarrollo del disco oral y glándulas adhesivas en vista frontal de embriones de *Phyllomedusa sauvagii*. A. Estadio 21, labio superior e inferior; B. Estadio 22, papilas marginales y máximo desarrollo de glándulas adhesivas; C. Estadio 24, fila P3 desarrollándose; D. Estadio 24, fila A2 desarrollándose; E. Estadio 25, mostrando los dientes labiales en desarrollo en las filas A1, P1 y P2; F. Estadio 25, mostrando papilas marginales inferiores completas y dientes labiales en todas las filas. Escala = 100 μm .

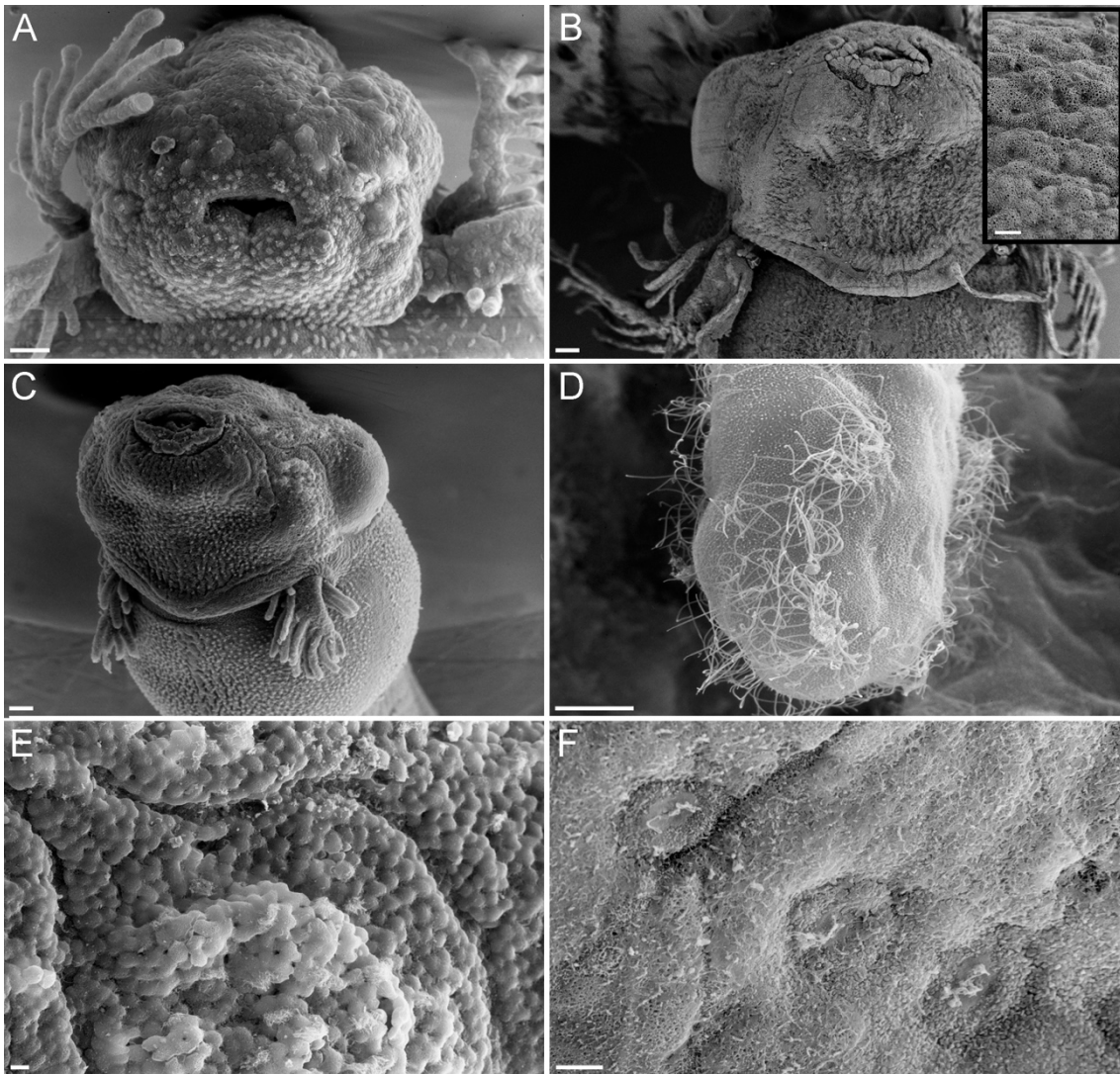


Figura 8. Microscopía electrónica de barrido de embriones de *Phyllomedusa sauvagii*. A. Estadio 21, vista frontal en donde se observa el estomodeo y las glándulas adhesivas; B. Estadio 22, vista antero-lateral en donde se observa el disco oral en desarrollo, las glándulas adhesivas, los surcos sensoriales, y un detalle de las células de la glándula de eclosión; C. Estadio 24+, vista ventrolateral en donde se observa el pliegue opercular, las branquias reducidas y los surcos sensoriales; D. Detalle de un filamento secundario branquial, mostrando una ciliación profusa; E. Detalle de las surcos sensoriales, en donde se observa la ausencia de neuromastos; F. Estadio 26, detalle de la misma línea lateral en donde se observa neuromastos desarrollados. Escalas = A-C 100 μm ; D-E 10 μm .

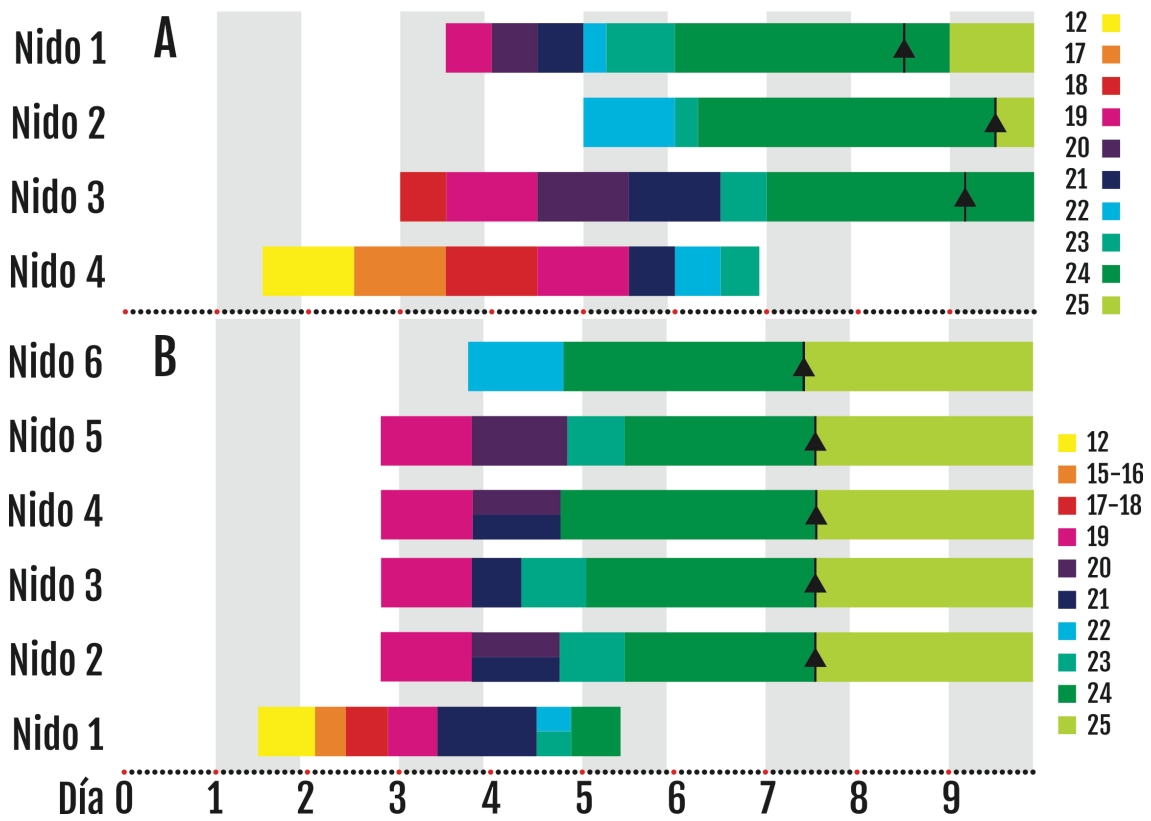


Figura 9. Variación temporal de los diferentes estadios a lo largo del desarrollo embrionario en 4 nidos de *Phyllomedusa boliviana* (A) y 6 nidos de *Phyllomedusa sauvagii* (B). Cada color corresponde a un estadio diferente. El símbolo triangular refiere al momento en el cual eclosiona todo el nido.

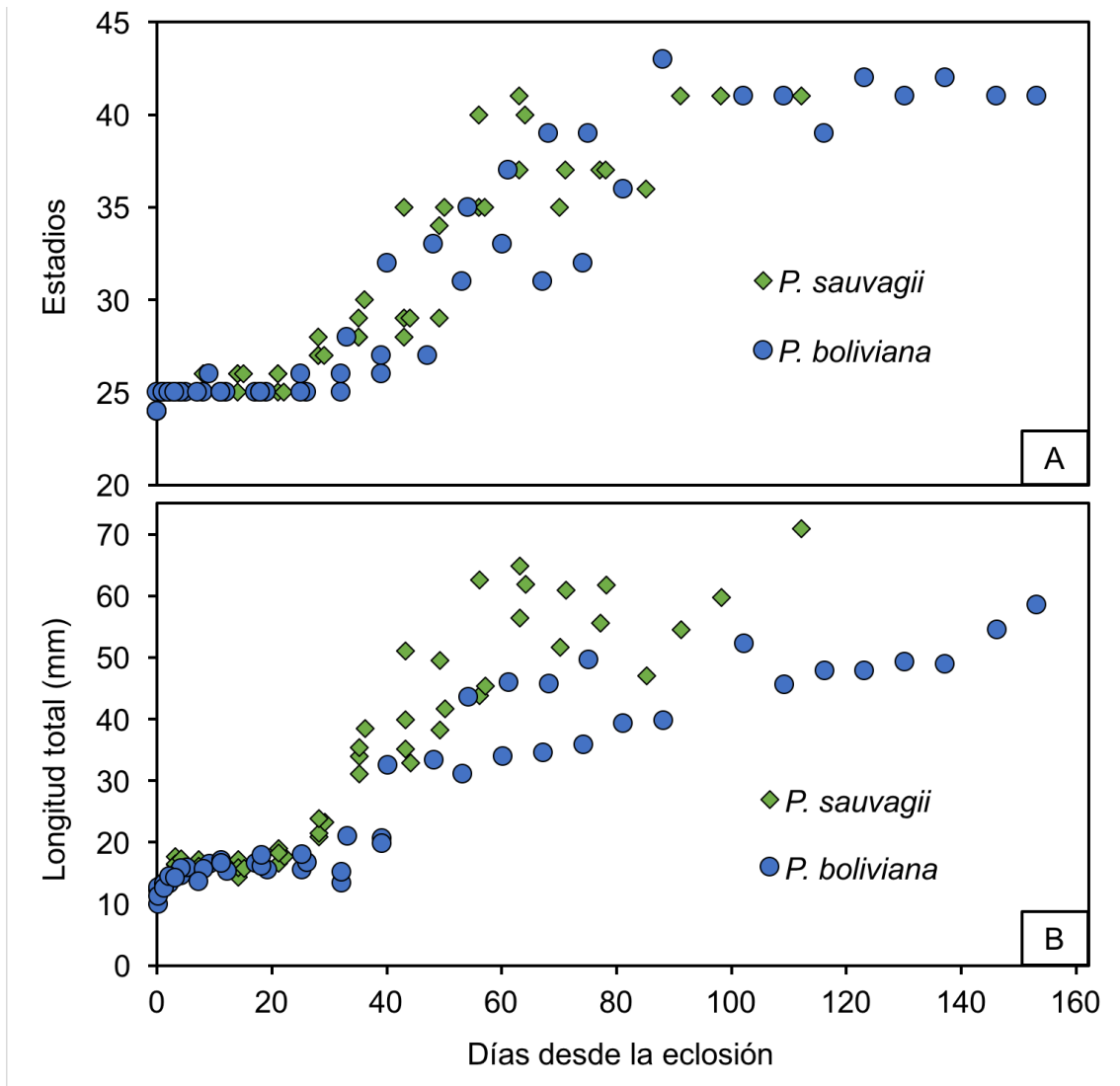


Figura 10. Estadios (A) y longitud total (B) a largo de las etapas embrionaria y larval de *Phyllomedusa boliviana* y *Phyllomedusa sauvagii*. Cada punto corresponde a un individuo diferente provenientes de 3 nidos de *P. boliviana* y 5 nidos de *P. sauvagii*.

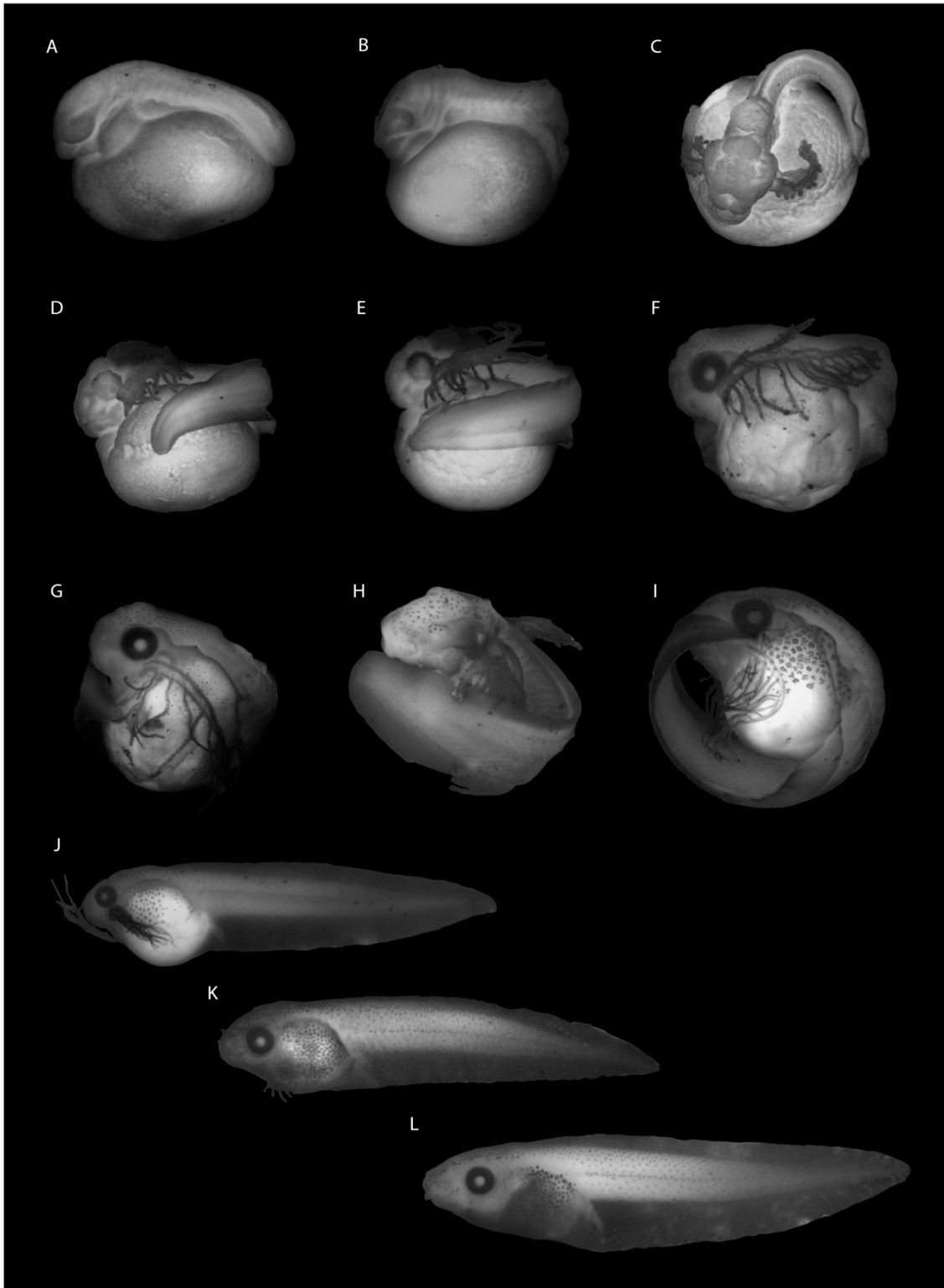


Figura 11. Serie de desarrollo de *Phyllomedusa tetraploidea*. A. Estadio 17; B. Estadio 18; C. Estadio 19; D. Estadio 19-20; E. Estadio 20; F. Estadio 21; G. Estadio 22; H. Estadio 23; I. Estadio 23+; J-K. Estadio 24; L. Estadio 25.

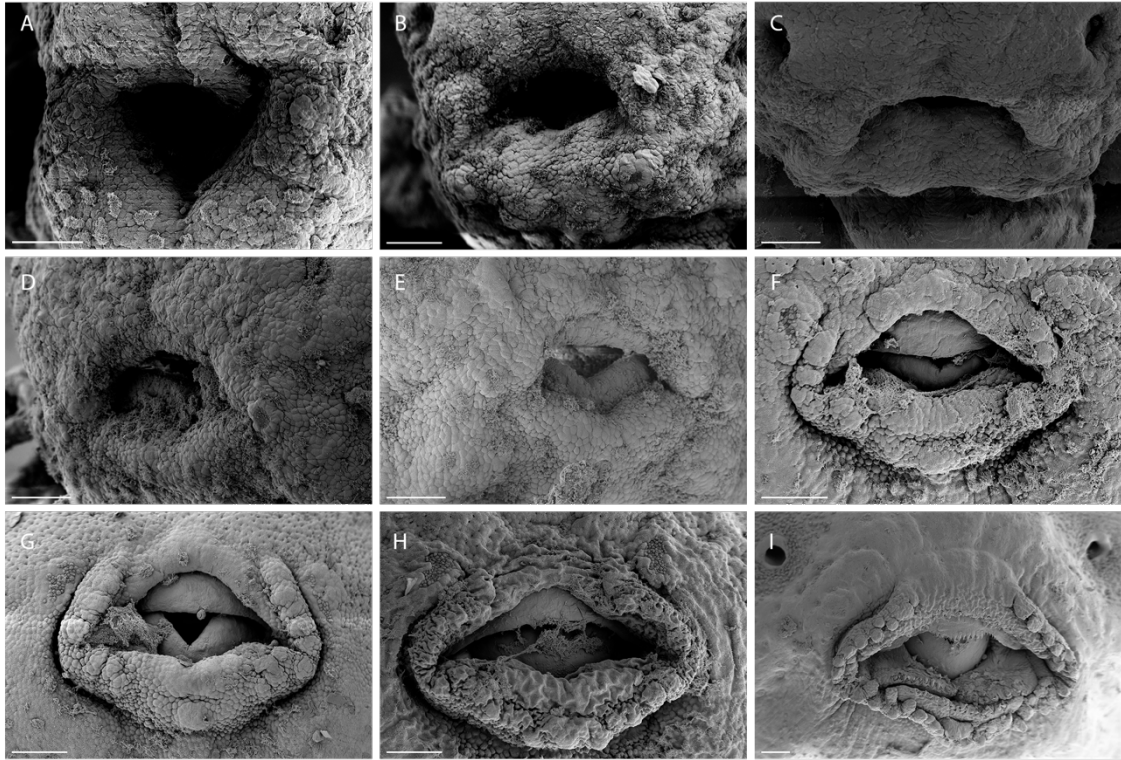


Figura 12. Desarrollo del disco oral y glándulas adhesivas en vista frontal de embriones de *Phyllomedusa tetraploidea*. A. Estadio 19, labio superior e inferior hendido; B. Estadio 19-20, desaparece hendidura inferior; C. Estadio 20, estomodeo alargado; D. Estadio 21, desarrollo de la mandíbula inferior; E. Estadio 22, vainas mandibulares superior e inferior definidas; F. Estadio 23, se esboza hilera A1, P1, P2 y P3; G. Estadio 23+, papilas marginales más desarrolladas; H. Estadio 24; I. Estadio 25, dientes en la A1, P1 y P2. Escalas = 100 μ m

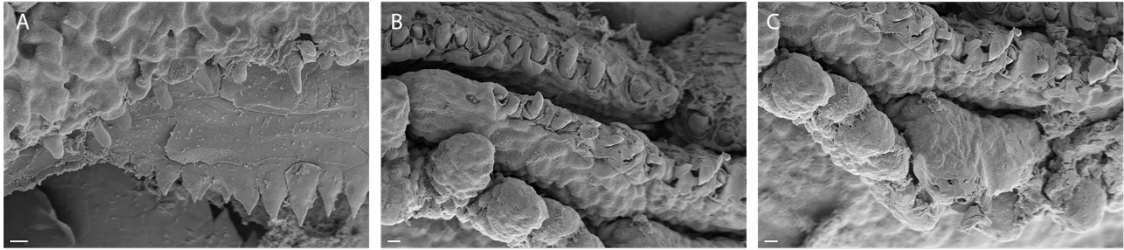


Figura 13. Detalle del disco oral en embrión de *Phyllomedusa tetraploidea* en Estadio 25, vista frontal. A. Vaina mandibular superior aserrada y dientes labiales emergentes de A1; B. Hilera P1 y P2 en donde se observa dientes emergiendo; C. Hilera P3 sin dientes labiales. Escalas = 10 μm

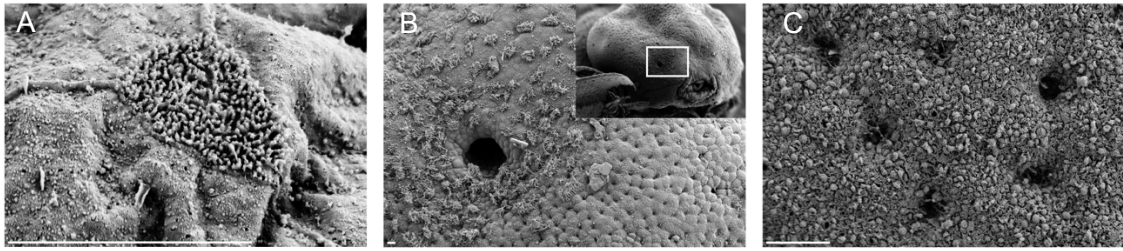


Figura 14. Microscopía electrónica de barrido de embriones de *Phyllomedusa tetraploidea*. A. Estadio 21, detalle de las microvellosidades de las células secretoras que forman las glándulas de eclosión; B. Estadio 23, zona alrededor de las narinas en donde se desarrolla la glándula de eclosión, en el recuadro superior vista frontal del embrión de referencia; C. Mayor detalle en donde se observa la disposición de las células secretoras. Escalas = 10 μm

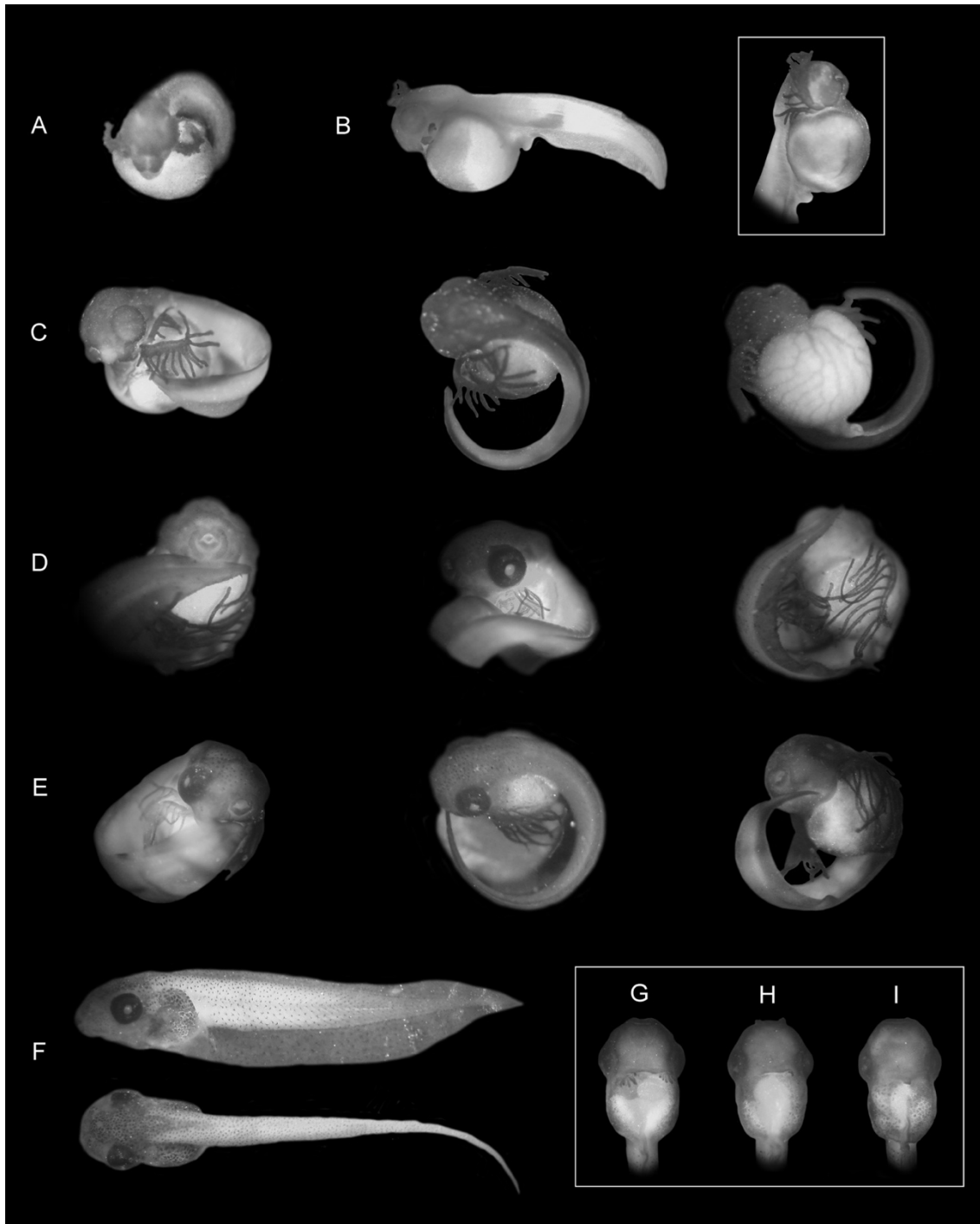


Figura 15. Serie de desarrollo de *Pithecopus azureus*. A. Estadio 19; B. Estadio 21, en donde se observa el desarrollo desigual de las branquias en este espécimen; C. Estadio 21; D. Estadio 22; E. Estadio 23, embrión eclosionado; F-I. Estadio 24-25, en donde se observa el desarrollo del espiráculo.

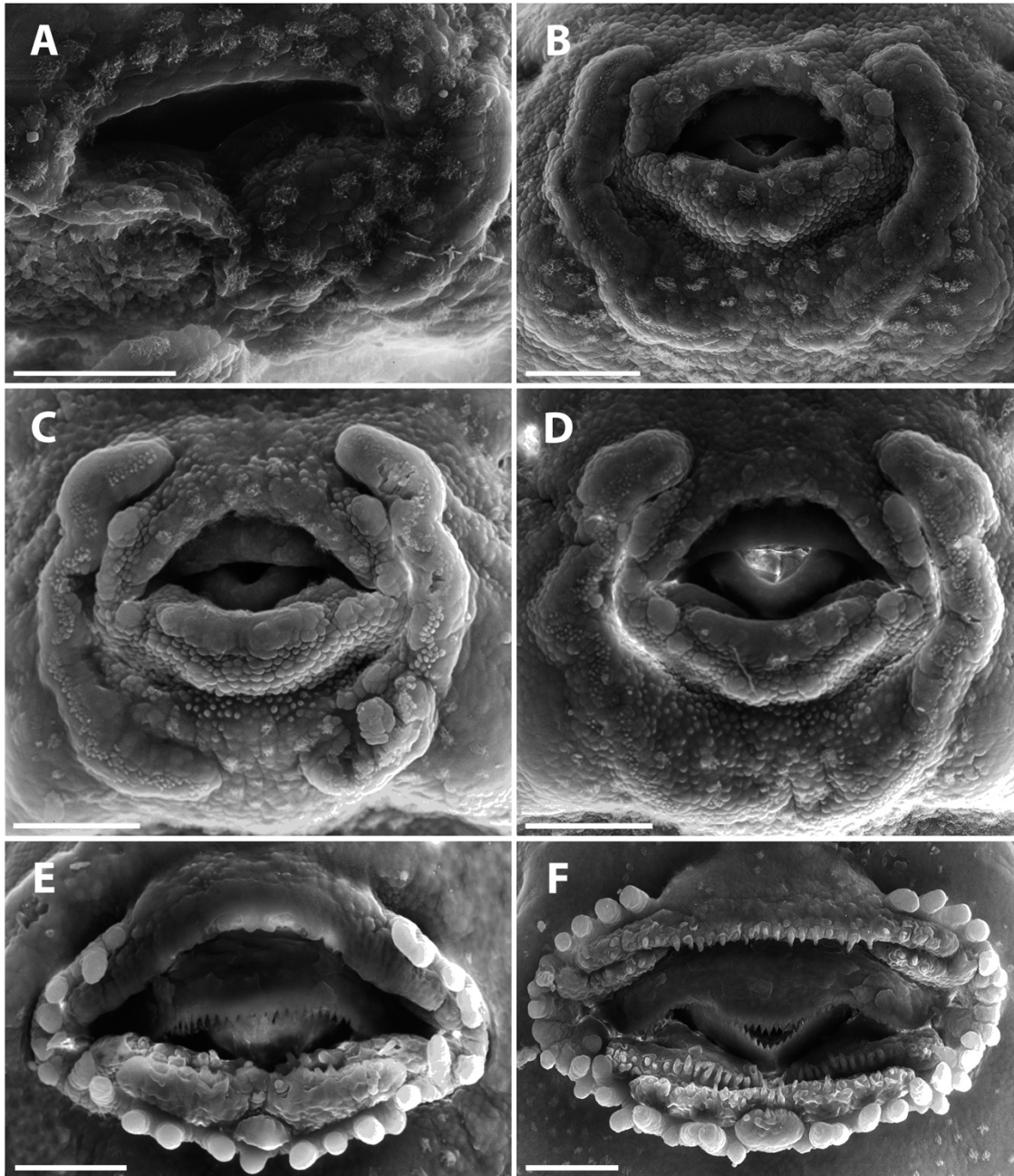


Figura 16. Desarrollo del disco oral en vista frontal de embriones de *Pithecopus azureus*. A. Estadio 21, labio superior e inferior; B. Estadio 22; C. Estadio 23 en donde se observa máximo desarrollo de las glándulas adhesivas. El recuadro muestra la región dorsal al labio superior, donde se observan células de gran tamaño presumiblemente correspondientes a células de eclosión tardías; D. Estadio 23+; E. Estadio 24; F. Estadio 27, mostrando dientes labiales en todas las filas. Escala = 100 μm .

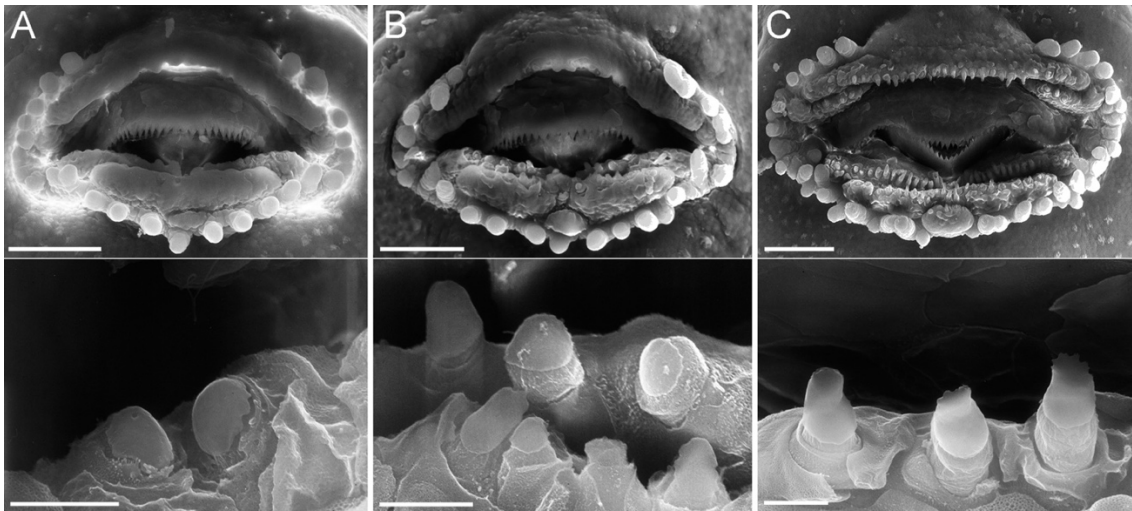


Figura 17. Desarrollo del disco oral de embrión de *Pithecopus azureus* después de eclosionar; arriba, disco oral en vista frontal; abajo, detalle de los dientes labiales. A. Estadio 24, diente labial en hilera P1; B. Estadio 24, diente labial en hileras P1 y P2; C. Estadio 27, diente labial en hilera labial P3. Escalas = 100 μm (arriba) y 10 μm (abajo).

Tabla 2. Medidas morfométricas (media \pm desviación estándar) en mm de larvas de *Phyllomedusa boliviana* en diferentes estadios de desarrollo (Gosner, 1960). N= número de individuos medidos; LT= longitud total; LCu= longitud del cuerpo; LCo= longitud de la cola; ACu= altura máxima del cuerpo; AMC= altura máxima de la musculatura caudal; AAC= altura máxima de la aleta caudal.

Estadio	N	LT	LCo	LCu	ACu	AMC	AAC
25	13	15,2 \pm 1,6	11,3 \pm 1,2	4,8 \pm 0,7	2,9 \pm 0,3	1,4 \pm 0,1	3,2 \pm 0,5
26-28	7	17,8 \pm 3,2	12,3 \pm 3,1	6,3 \pm 1,2	3,7 \pm 0,8	1,7 \pm 0,3	3,8 \pm 0,8
31-35	7	35,0 \pm 4,1	27,2 \pm 6,4	14,1 \pm 1,9	8,6 \pm 0,7	3,5 \pm 0,6	7,7 \pm 0,8
36-39	5	45,7 \pm 3,9	35,8 \pm 2,9	18,3 \pm 1,5	10,6 \pm 1,1	4,6 \pm 0,6	8,8 \pm 0,8
41-42	7	51,0 \pm 4,4	40,0 \pm 2,9	21,6 \pm 2,6	11,8 \pm 1,6	6,1 \pm 0,4	11,2 \pm 1,4

Tabla 3. Medidas morfométricas (media \pm desviación estándar) en mm de larvas de *Phyllomedusa sauvagii* en diferentes estadios de desarrollo (Gosner, 1960). Abreviaturas como en Tabla 1.

Estadio	N	LT	LCo	LCu	ACu	AMC	AAC
25	15	15,8 \pm 1,6	10,7 \pm 1,1	5,1 \pm 0,7	2,7 \pm 0,3	1,4 \pm 0,1	3,2 \pm 0,3
26-28	13	22,2 \pm 7,1	14,4 \pm 4,2	7,8 \pm 2,9	4,2 \pm 1,7	1,8 \pm 0,7	4,4 \pm 1,7
29-37	16	46,8 \pm 8,9	29,3 \pm 5,4	17,5 \pm 3,8	10,1 \pm 2,3	4,4 \pm 1,2	9,5 \pm 2,1
40-41	6	62,4 \pm 5,5	39,2 \pm 4,9	23,2 \pm 2,8	13,0 \pm 2,5	6,0 \pm 0,9	11,7 \pm 2,8

CAPÍTULO III

ECLOSIÓN PLÁSTICA

ANTECEDENTES

La eclosión representa el primer punto de transición al que se enfrentan los animales con ciclos de vida complejos. Durante la eclosión se producen cambios relacionados al hábitat, dieta, depredadores y susceptibilidad a factores físicos, que en su conjunto han sido denominados cambios de nichos ontogenéticos (Werner y Gilliam, 1984). Existe un gran interés en entender en qué momento se producen estos cambios y cuáles son las fuerzas selectivas que afectan estos puntos de transición. Una de las características de las etapas de transición es que se encuentran bajo restricciones de dos ambientes diferentes, a diferencia de los fenotipos que caracterizan cada etapa que se encuentran bajo selección directa por parte de un solo ambiente.

La gran mayoría de los estudios de ciclos de vida complejo se enfocan en la metamorfosis. Wilbur y Collins (1973) y posteriormente Werner y Gilliam (1984) y Werner (1986) desarrollaron un modelo que predice que la metamorfosis en anuros se produce cuando la relación costo/beneficio en la próxima etapa se vuelve más favorable que en la etapa actual. Los costos/beneficios dependen tanto de las condiciones ambientales como del fenotipo del organismo (por ejemplo, del tamaño). Cuando los riesgos aumentan y disminuyen los beneficios durante la primera etapa, los individuos tienden a acelerar la transición. Por el contrario, si aumenta el riesgo y disminuyen los beneficios en la segunda etapa, tienden a retrasar la transición (Werner, 1986).

Este modelo teórico también se aplica para estudios de eclosión (Sih y Moore, 1993; Warkentin, 1999) y la principal diferencia se basa en cómo determinar los costos y beneficios. Los estudios clásicos basados en la teoría de cambios de nicho estiman el tamaño óptimo en el que se producen los puntos de transición (Werner y Gilliam, 1984). Sin embargo, en estudios de eclosión se considera que los cambios morfológicos que se dan durante el desarrollo son mejores indicadores que el tamaño (Warkentin, 1999). Esto se debe, por un lado, a que los embriones no se alimentan y el crecimiento está limitado por los recursos provistos por la madre (el vitelo). De esta forma, los cambios que se producen son principalmente morfológicos y no relacionados al tamaño. Por otra parte, estos cambios morfológicos producidos durante el desarrollo afectan las interacciones con el ambiente. Esto significa que a medida que transcurre el desarrollo embrionario, los embriones adquieren diferentes habilidades y capacidades que les permite detectar costos y beneficios

durante esta etapa. Por ejemplo, pueden restringir el momento en que se produce la eclosión y la habilidad para detectar amenazas (Warkentin *et al.*, 2017).

La eclosión en muchos animales puede estar inducida por el ambiente (Warkentin, 2011a). Esta plasticidad en la eclosión fue registrada en 38 especies de anfibios (Warkentin, 2011b). Entre ellas se encuentra la rana arborícola de ojos rojos *Agalychnis callidryas*, probablemente la especie más estudiada al respecto. Se ha demostrado que los embriones de esta especie adelantan el tiempo de eclosión en respuesta al ataque de serpientes (Warkentin, 1995), avispas (Warkentin, 2000a), infección por hongos (Warkentin *et al.*, 2001), por inundación (Warkentin, 2002) y por deshidratación (Salica *et al.*, 2017). Al presentar los embriones diferentes edades de eclosión, ingresan a la etapa larval con diferentes morfologías y esto afecta su interacción con el ambiente (Warkentin, 1995, 1999). De esta manera, los embriones que eclosionan antes logran escapar de sus depredadores, pero son más vulnerables a los depredadores acuáticos en la siguiente etapa de vida (Warkentin, 1995, 1999; Gomez-Mestre *et al.*, 2008). Además, embriones con eclosión temprana comienzan a alimentarse e inician su crecimiento más rápido (Warkentin, 1999).

Los embriones de anuros presentan una gran variedad de tipos de respuesta a factores ambientales que involucran diferentes señales y mecanismos (Warkentin, 2011b). En el caso de *A. callidryas*, los embriones utilizan diferentes modalidades sensoriales que indican diferentes tipos de amenaza. Por ejemplo, cuando los nidos son atacados por serpientes, se producen vibraciones que los embriones son capaces de percibir y distinguir de vibraciones inofensivas como las producidas por la lluvia (Warkentin, 1995; Warkentin *et al.*, 2007; Caldwell *et al.*, 2009). Ante este ataque todos los embriones del nido responden eclosionando temprano de manera rápida y sincrónicamente (Warkentin, 1995). Por su parte, cuando la amenaza se da por inundación de los huevos, los embriones detectan la falta de oxígeno en el agua (Warkentin, 2002) y responden eclosionando lenta y paulatinamente. Cuando la amenaza proviene de ataques producidos por avispas, sólo eclosionan de manera rápida los embriones próximos a los lugares del ataque (Warkentin, 2000). En cambio, cuando la amenaza está dada por infección con hongos y deshidratación la respuesta de eclosión es similar a la producida por inundación (Warkentin, *et al.*, 2001; Salica, *et al.*, 2017). Los mecanismos involucrados en la detección de estas dos últimas amenazas aún no se conocen. Por otra parte, como se mencionó anteriormente, el desarrollo impone ciertas restricciones, tal que la respuesta de los embriones a los diferentes estímulos varía en función de la aparición de estructuras sensoriales. Por ejemplo, la capacidad de detectar el oxígeno en esta especie aparece muy temprano en el desarrollo, en el estadio 16 previo a la eclosión, cuando los embriones se orientan en gradientes de oxígeno dentro del huevo (Rogge y Warkentin, 2008). Por este motivo, la eclosión temprana en respuesta a hipoxia se da antes que la respuesta a perturbación

mecánica (Warkentin *et al.*, 2017). La respuesta tardía ante el ataque de serpientes podría estar condicionada por el desarrollo de mecanorreceptores ubicados en el oído medio (Kim *et al.*, 2016). Por su parte, el sistema de líneas laterales parece no estar involucrado en la percepción de las vibraciones, ya que se encontraron neuromastos desarrollados y funcionales en embriones de 3 días de edad (Cohen *et al.*, 2019), es decir, antes que los embriones adquieran la capacidad de eclosionar por perturbación mecánica (que se produce a partir de los 4 días, Warkentin *et al.*, 2017).

Se ha reportado plasticidad en la eclosión en respuesta a inundación en casi todos los phyllomedusidos testeados hasta la actualidad (*Agalychnis annae*, *A. callidryas*, *A. moreletii*, *A. saltator*, *A. spurrelli*, y *A. dacnicolor*, Gomez-Mestre *et al.*, 2008; *Phyllomedusa trinitatis*, Downie *et al.*, 2013). Gomez-Mestre *et al.* (2008) también encontraron en las seis especies de *Agalychnis* estudiadas, eclosión temprana producida por el ataque de serpientes, aunque en este caso la intensidad de la respuesta varía dependiendo de la especie y las características biomecánicas de los nidos. En *Phyllomedusa trinitatis*, Downie *et al.* (2013) exploraron la capacidad de los embriones de eclosionar tempranamente en respuesta a precipitación simulada, y no obtuvieron respuesta. Los nidos de las especies de *Phyllomedusa*, a diferencia de *Agalychnis*, presentan hojas que envuelven la puesta y cápsulas de gelatina entre los huevos (Faivovich *et al.*, 2010). Estas diferencias podrían afectar tanto el proceso de eclosión como también la capacidad de los embriones de percibir estímulos externos (Downie *et al.*, 2013).

En este capítulo se proponen los siguientes objetivos:

- Investigar los factores bióticos (riesgo de depredación) y/o abióticos (precipitaciones e inundación) que podrían afectar el momento de la eclosión.
- Determinar cuáles son las consecuencias morfológicas de eclosionar a distintas edades, considerando fundamentalmente estructuras relacionadas a la alimentación, locomoción e intercambio gaseoso.

Las hipótesis de trabajo proponen que:

- La eclosión en *Phyllomedusa* es un evento plástico, tal que los embriones pueden adelantar el momento en que ocurre en respuesta a depredadores y exceso de agua.
- La eclosión precoz induce cambios en la morfología embrionaria que inicialmente compensan el menor desarrollo con el que los embriones entran a la vida libre.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para estudiar aspectos de la eclosión plástica en *P. boliviana* y *P. sauvagii* se trabajó con un total de 8 y 11 nidos respectivamente. En la Tabla 1 del Capítulo inicial se sintetiza la

información y tratamiento de cada nido, y en la Figura 18 se resume el diseño experimental principal. Los nidos se trasladaron al laboratorio y se dispusieron suspendidos de un trípode construido con varillas de madera ubicado sobre una bandeja con agua (Fig. 19, Downie *et al.*, 2013). La edad de los nidos, cuando no se pudo garantizar con observaciones directas, se estimó a través de los estadios de desarrollo de una muestra de huevos, y su comparación con los datos del desarrollo normal. Se seleccionaron tres estímulos de eclosión temprana, siguiendo los antecedentes comentados para otros phyllomedusidos y adaptando a posibles escenarios naturales de las especies bajo estudio: depredación de nidos (factores bióticos) e inundación y precipitaciones (factores abióticos). La información sobre depredación de nidos en las especies estudiadas es muy dispersa, por lo que fue necesaria una exploración previa. La eclosión temprana por inundación puede producirse en la naturaleza por diversos motivos como el aumento del nivel de agua de los charcos, caída accidental de los nidos al agua por acción de animales, viento u otros estímulos mecánicos. Las precipitaciones por su parte, podrían tener un papel importante en especies que se distribuyen en ambientes más extremos (e.g., región chaqueña en *P. sauvagii*), donde las precipitaciones concentradas aseguran la disponibilidad de agua en los charcos.

Eclosión temprana por depredación de nidos e infección fúngica

Entre los años 2014 y 2018 se colectó un total de 25 nidos de *P. boliviana* y 49 nidos de *P. sauvagii* en diferentes momentos del desarrollo embrionario. Además de los nidos colectados, durante la temporada de actividad se realizaron viajes periódicos (semanales en *P. sauvagii* y mensuales en *P. boliviana*) al área de distribución de estas dos especies, relevando las poblaciones. En ninguno de estos nidos, se encontraron signos evidentes de depredación. La única excepción fue 1 nido de *P. sauvagii* infectado por un hongo (Fig. 20). Este nido se trasladó al laboratorio y fue controlado periódicamente con el fin de registrar el momento de la eclosión de los embriones. El enfoque experimental respecto de depredación de nidos entonces no pudo realizarse y no consta en la síntesis de la Figura 18.

Eclosión temprana por inundación

Para este experimento se utilizaron 5 nidos de *P. boliviana* y 10 de *P. sauvagii* (Tabla 1). Para determinar si los embriones son capaces de eclosionar en respuesta a la inundación, y determinar el momento y estadio del desarrollo en que se adquiere la facultad (inicio del período plástico) se siguió una adaptación del protocolo de Warkentin (2002). El protocolo empleado consistió en extraer de manera periódica (dos veces al día) una pequeña muestra del nido (2 o más huevos con sus respectivas cápsulas) e inmediatamente sumergirla en agua. Los huevos se mantuvieron sumergidos durante 3

horas aproximadamente y si en ese lapso no se producía la eclosión, los embriones se fijaron para determinar el estadio de desarrollo. Los embriones que respondían eclosionando ante la inundación fueron también inmediatamente fijados para determinar su estadio de desarrollo. El resto de los huevos dentro de cada nido no fueron disturbados para que continúen con su desarrollo normal (control) y se registró el momento en el eclosionaron de manera espontánea. Se decidió extraer huevos en vez de sumergir todo el nido, como en la propuesta original, porque así es posible contar con un mayor número de réplicas. Al inundar un nido completo cuyos embriones no tienen la capacidad de salir del huevo, la estructura del nido se ve afectada por lo que ese nido debe ser desestimado y se debe usar un nido nuevo para el siguiente registro. Por este motivo realizar ese protocolo implicaba contar con un gran número de nidos para obtener suficientes réplicas y lamentablemente no contábamos con esa cantidad de nidos en los sitios de colecta. Asumimos que la respuesta de eclosión será la misma independientemente de si se inunda todo el nido o una pequeña porción.

Eclosión temprana por precipitaciones

Se realizó una exploración preliminar sometiendo nidos en período plástico a un goteo persistente de agua de clorificada durante 5 minutos, siguiendo la metodología de Downie *et al.* (2013). La prueba se realizó con 1 nido de cada especie, y en ambos casos observamos que, como en *Phyllomedusa trinitatis* del estudio mencionado, las características compactas del nido impiden el ingreso del agua a su interior. Por lo tanto en ningún caso obtuvimos respuesta de eclosión temprana, y el experimento fue discontinuado y no consta en la síntesis de la Figura 18.

Consecuencias de eclosionar a diferentes edades

Se trabajó con 7 nidos de *Phyllomedusa sauvagii* y 4 nidos de *Phyllomedusa boliviana* (Tabla 1; Fig. 18). Para probar la facultad de eclosión precoz en los nidos, en los 7 de *P. sauvagii* y en 1 de *P. boliviana* se separó periódicamente (2 veces al día) un huevo que fue inmediatamente inundado. Una vez que se logró la respuesta de eclosión se procedió a la preparación de los tratamientos. Se separó aproximadamente la mitad de cada nido, tratando de no alterar su estructura, y se inundó la masa de huevos para inducir la eclosión temprana (tratamiento temprano). El resto de la puesta no fue perturbado, permitiendo que los huevos continúen con su desarrollo (control). Todos los nidos de *P. sauvagii* fueron divididos en tratamiento temprano y control. Se siguió esta metodología con un único nido de *P. boliviana* porque se tuvo problemas para encontrar una mayor cantidad de nidos de esta especie que estuvieran en estadios tempranos del desarrollo. Para aumentar la muestra se usó embriones provenientes de 3 nidos de otros experimentos

(Figura 18), en donde se utilizó el mismo protocolo. De esos 3 nidos, uno fue íntegramente inundado una vez que alcanzaron la capacidad de eclosionar (tratamiento temprano) y dos no se perturbaron (control).

Ejemplares de ambos tratamientos fueron fijados inmediatamente al inicio del experimento. Para evaluar las diferencias morfológicas en embriones eclosionados temprana y espontáneamente, 2 embriones de cada tratamiento fueron fijados una vez por día y al mismo momento. En el tratamiento temprano, esto implicó fijar embriones ya eclosionados, mientras que para el control, los embriones de los primeros días estaban aún en el nido. Los especímenes fijados fueron fotografiados en vista lateral y ventral con una escala de referencia. En las fotografías en vista lateral se tomaron las siguientes medidas morfométricas (Fig. 21A): longitud total (LT), longitud del cuerpo (LC), altura del cuerpo (AC), altura máxima de la musculatura caudal (AMC), altura máxima de la aleta caudal (ALC) y largo del eje mayor de la branquia más desarrollada (Fig. 21B). En las imágenes en vista ventral se midió la longitud de la espira del tracto digestivo, con una curva desde el punto de origen hasta la base de la cola. Las mediciones se realizaron con el programa ImageJ (Schneider *et al.*, 2012). Para examinar la configuración del disco oral, líneas laterales, glándulas adhesivas y de eclosión, 8 especímenes por especie fueron preparados para microscopía electrónica de barrido, siguiendo un protocolo de rutina de deshidratación, punto crítico y metalización con oro. Una muestra de *P. sauvagii* fue exclusivamente estudiada bajo lupa binocular, para lo que se tomaron fotografías de la región oral contrastada con azul de metileno.

Análisis estadístico

Para explorar las variaciones en las medidas registradas a lo largo del tiempo en el cuerpo se realizó un modelo lineal general usando como covariable los días de desarrollo. En el caso de las medidas relacionadas a la forma, además de los días, también se usó como covariable la longitud total. Para analizar los datos de las branquias y tracto digestivo entre embriones eclosionados a diferentes edades se realizó un test de Wilcoxon. Se usó este test debido a la naturaleza de los datos y el tamaño de la muestra que no permiten suponer normalidad de los datos. En el caso de *P. sauvagii* se usó un test de Wilcoxon apareado debido al diseño usado en todos los nidos: medidas tomada en individuos provenientes del mismo nido fijados en el mismo momento. Por su parte, en *P. boliviana*, se utilizó esta misma metodología para un solo nido, dado que el resto de los nidos correspondía a uno u otro tratamiento. Para las branquias se realizó una relación entre la longitud del eje mayor de las branquias y la longitud total del cuerpo. Los resultados se sintetizan como curvas de crecimiento con el eje X mostrando la progresión del tiempo real post-oviposición, lo que implica que los especímenes comparados tienen la misma edad.

RESULTADOS

Eclosión temprana por infección fúngica

En el único nido de *P. sauvagii* infectado por un hongo (Fig. 20) no se observaron cambios en el tiempo de eclosión respecto a otros nidos en condiciones normales. Los embriones eclosionaron al octavo día, en una proporción de casi el 80% de eclosión exitosa.

Eclosión temprana por inundación

La inundación fue el único factor que mostró efectos sobre la eclosión, acelerando el tiempo en las dos especies bajo estudio. Los embriones de *P. boliviana* sumergidos eclosionaron a partir del día 7 y en estadio 24 (Fig. 22A), mientras que el resto de los embriones continuó su desarrollo dentro del nido por dos días más (Tabla 4; Fig. 22B). Por su parte, los embriones sumergidos de *P. sauvagii* fueron capaces de eclosionar a partir del día 4 y en estadio 24 (Fig. 22C), mientras que la eclosión normal ocurre hasta tres días después (Tabla 5; Fig. 22D).

Consecuencias morfológicas de eclosionar a diferentes edades

Los resultados se presentan para cada variable/estructura morfológica considerada, sintetizando los hallazgos para cada especie. Vale recordar para la interpretación de estos párrafos, que en cada figura los embriones contemporáneos pueden estar fuera y dentro del huevo (en lapso de tiempo entre que eclosionan los embriones del tratamiento temprano y cuando eclosionan espontáneamente los embriones control); al momento de estar todos en el agua, los embriones precoces ya llevan días en el medio acuático.

Morfometría corporal

En *P. boliviana*, ninguna de las medidas corporales registradas resulta significativamente diferente entre embriones eclosionados temprana y espontáneamente (Tabla 6), pero algunas variaciones se insinúan en una observación día por día de las curvas de crecimiento. Un día luego de eclosionar (día 8), se registra en los embriones un leve aumento de la longitud total (Fig. 23A), mientras que la longitud y altura del cuerpo disminuyen ligeramente (Figs. 23B-C). Estas diferencias desaparecen al día 9, cuando eclosionan los embriones del Control. No se observan diferencias entre la altura de la musculatura y aleta caudal hasta el día 9, en que la musculatura de las larvas control aumenta y la altura de la aleta caudal disminuye (Figs. 23D-E). Al final en el día 13 las larvas control tienden a tener mayores valores para todas las variables excepto el largo del cuerpo.

Por su parte, en los embriones con eclosión temprana de *P. sauvagii* se observa una tendencia a una mayor longitud total desde el día 4 al 7 (Fig. 24A; Tabla 7). La altura del cuerpo es menor los días 5 y 6 para embriones con eclosión temprana vs. embriones control y esto se revierte el día 7 y 10 (Fig. 24C). Todas estas diferencias desaparecen el día 10 dando como resultados larvas de ambos tratamientos con forma y tamaño similares.

Durante el resto del período larval, las curvas decrecimiento (incremento de longitud total en el tiempo) se mantienen muy similares entre embriones eclosionados temprana y espontáneamente, en ambas especies estudiadas (Fig. 25). Las variaciones de tamaño detalladas por día de desarrollo, junto con resultados de las demás medidas corporales y aspectos de los metamorfos eclosionados temprana y espontáneamente se retoman en Capítulo siguiente.

Branquias

Los resultados obtenidos muestran que la eclosión temprana incide significativamente en el desarrollo de las branquias en las dos especies (Test de Wilcoxon apareado, Control vs. Temprano, *P. boliviana* $W= 43,0$; $P < 0,05$ Fig. 26A; *P. sauvagii* $Z=1.94$, $P=0.01$, Fig. 26B). Los embriones que eclosionaron temprano reabsorben más rápidamente sus branquias luego de entrar al agua, a diferencia de los del grupo control, en donde la regresión ocurre lentamente dentro del huevo, de manera tal que ya eclosionan con branquias pequeñas.

Tracto digestivo

El tracto digestivo se desarrolla más temprano en ejemplares de *P. sauvagii* con eclosión temprana, con edad de eclosión de 4 y 5 días, comparado con individuos de 6 y 7 días de edad de eclosión (Control vs. Temprano, Wilcoxon, $Z=-3.77$ $P= 0.001$; Fig. 27). La diferenciación más temprana de las espiras (a partir del día 5) respecto del control (día 7) puede apreciarse en las imágenes correspondientes (Figs. 28B y 28H). Los datos para *P. boliviana* se registraron preliminarmente porque muchos ejemplares fueron accidentalmente dañados. Con el escaso material disponible sin embargo, puede apreciarse que la tendencia observada es similar (Fig. 28).

Disco oral

En *Phyllomedusa boliviana*, durante el día 7 cuando eclosionan los embriones del tratamiento Temprano, el disco oral presenta las hileras A1, P1 y P2 bien definidas (Fig. 29A). Se observan 5 papilas en la región comisural y las vainas mandibulares presentan márgenes ligeramente queratinizados. En el día 8, los individuos del tratamiento Temprano presentan un disco oral con todas las hileras definidas, papilas completas y mayor

queratinización de las vainas mandibulares. En los días 9 (Fig. 29B) y 10 (Fig. 29C), la hilera labial P3 está diferenciada, el margen papilar aparece casi completo, con un pequeño claro ventral remanente, y las vainas mandibulares están completamente aserradas; dientes labiales comienzan a esbozarse en las hileras A1, P1 y P2. Por el contrario, durante los mismos días (Fig. 29D y 29E), los embriones del experimento control muestran un disco retardado en su desarrollo, con vainas mandibulares sin aserraduras, y papilas, P3 y dientes labiales diferenciándose más tarde.

En *Phyllomedusa sauvagii*, en el día 4, la eclosión más temprana registrada en esta especie, los individuos presentan un disco oral con hileras A1, P1 y P2 bien definidas, P3 esbozada, 4 papilas comisurales y las vainas mandibulares con márgenes ligeramente ondulados (Fig. 30A). Se observa el mismo patrón que en la especie anterior, una aceleración del desarrollo del disco en embriones con eclosión temprana, concentrada fundamentalmente en el inicio de la queratinización y desarrollo del margen aserrado en las vainas mandibulares (día 5 y día 6; Figs. 30B y 30C) y la diferenciación de la P3 (día 5 y día 6; Figs. 30B y 30C) en comparación con embriones control (Figs. 30E-G).

Durante la eclosión temprana menos extrema al día 5 (Fig. 31), las diferencias entre embriones tratados y control son más sutiles, e incluyen principalmente una queratinización más rápida de las vainas mandibulares en los embriones con eclosión precoz (Figs. 31B y 31D). Sin embargo, el desarrollo se equipara rápidamente y al día 7, embriones con eclosión normal y temprana presentan discos con configuraciones similares (Figs. 31C y 31E).

Líneas laterales, glándula de eclosión y glándulas adhesivas

El contar con imágenes SEM de la región rostral nos permitió explorar preliminarmente las variaciones en el desarrollo de los neuromastos y glándulas adhesivas (cuando presentes) y de eclosión.

En *P. boliviana*, si bien con diferencias más sutiles, se observa una tendencia similar a lo que ocurre en el disco oral de embriones con eclosión temprana y normal (Fig. 32). En los embriones control, un día luego de la eclosión normal las células de eclosión son aún visibles, aunque en evidente regresión (Fig. 32D). Al mismo tiempo, en embriones que eclosionaron tempranamente las células de eclosión ya están ausentes (Fig. 32B). El desarrollo diferente de las líneas laterales se advierte tres días luego de la eclosión temprana, tal que embriones que llevan 3 días en el agua en lugar de 1, presentan neuromastos ya en grupos (“stitches”, Figs. 32C y 32E).

En *P. sauvagii* los resultados son similares. Los embriones que eclosionaron tempranamente muestran una regresión más rápida de las células de eclosión (Fig. 33B) y una ligera aceleración en la diferenciación de las líneas laterales (Fig. 33C) en comparación

con embriones control de las mismas edades (Figs. 33D y 33E). Adicionalmente, las glándulas adhesivas muestran una rápida regresión en embriones eclosionados tempranamente, tal que dos días luego de eclosionar precozmente (día 6) la región secretora muestra marcada reducción mientras que embriones control contemporáneos dentro del huevo aún exhiben la región secretora aún claramente diferenciada (Figs. 30C y 30D).

DISCUSIÓN

La discusión de estos resultados se presenta de manera integrada con las siguientes, en el Capítulo 5.

FIGURAS Y TABLAS

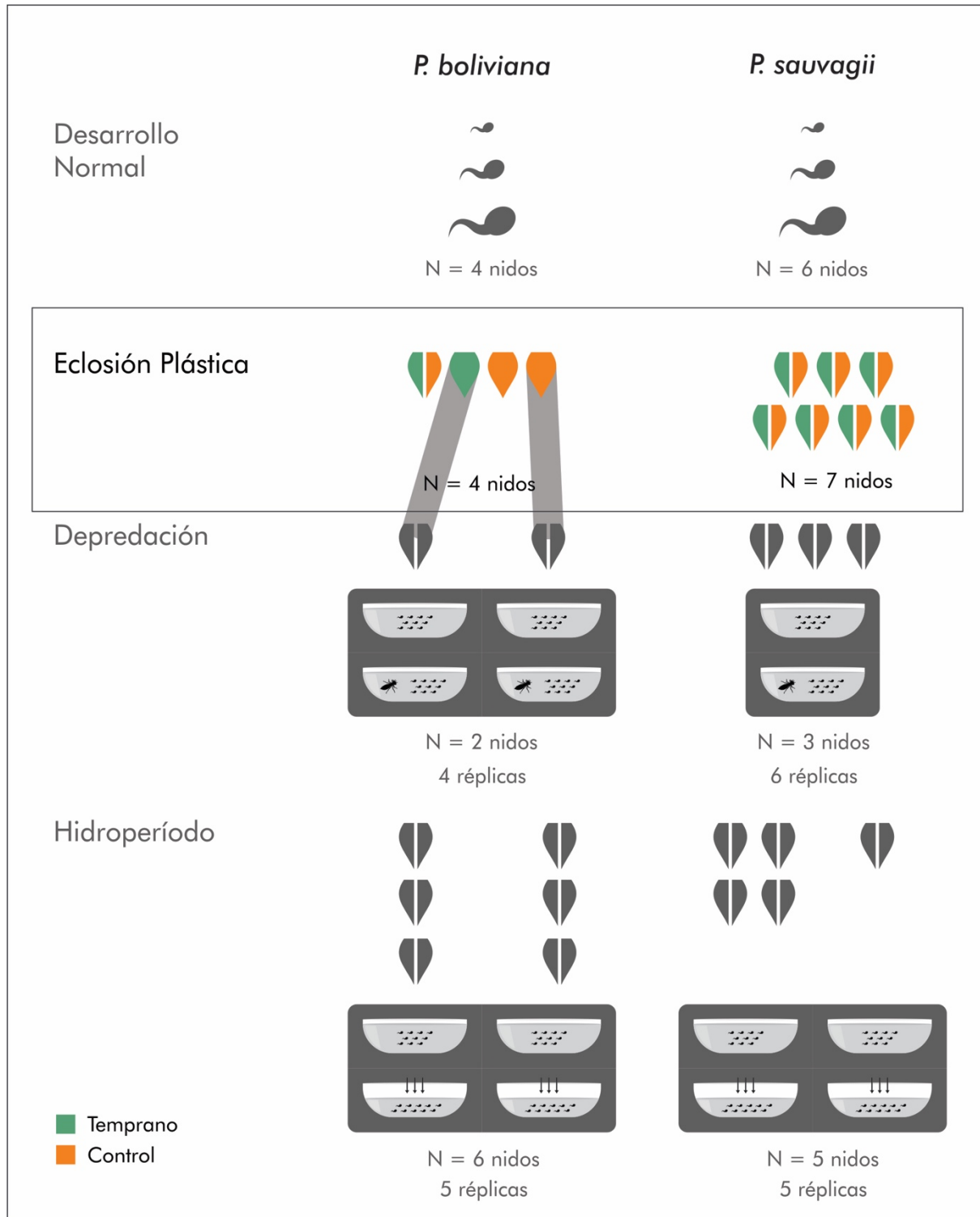


Figura 18. Resumen material y métodos empleados en este Capítulo, enfatizado en el esquema general. Los esquemas de colores representan nidos enteros o divididos para los experimentos, coloreados los embriones hayan eclosionado espontánea o inducida y precozmente.

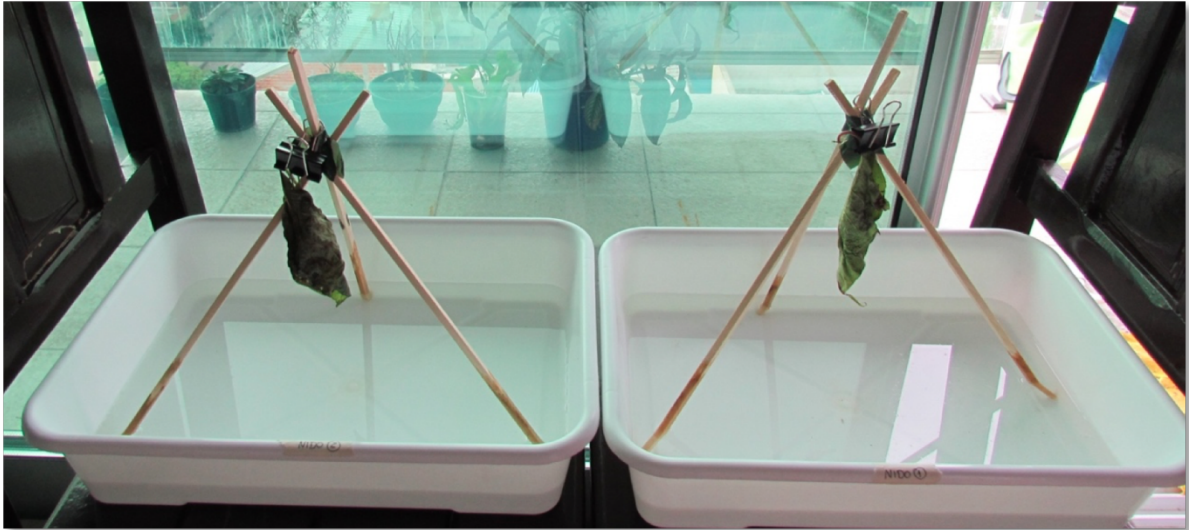


Figura 19. Nidos de *Phyllomedusa boliviana* colocados en trípodes sobre bandejas con agua.



Figura 20. Detalle de un huevo dentro de un nido de *Phyllomedusa sauvagii* infectado por un hongo.

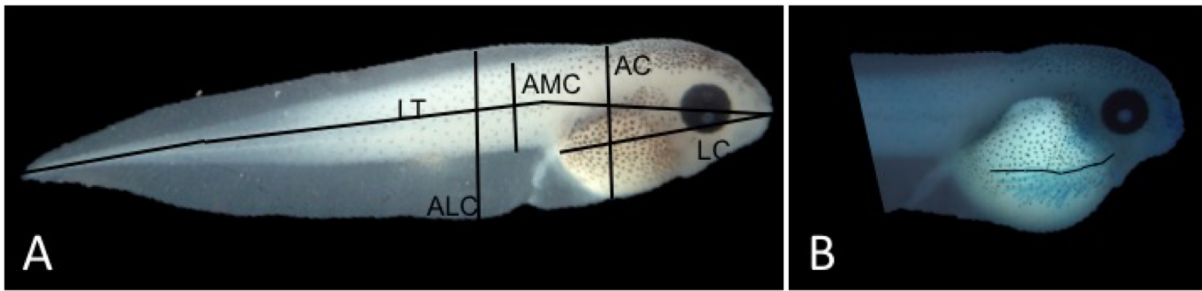


Figura 21. Medidas morfométricas tomadas en ejemplares de *P. sauvagii* y *P. boliviana*. (A) LT: longitud total; LC: longitud del cuerpo; AC: altura del cuerpo; AMC: altura máxima de la musculatura caudal; ALC: altura máxima de la aleta caudal. (B) Largo del eje mayor de la branquia más desarrollada.

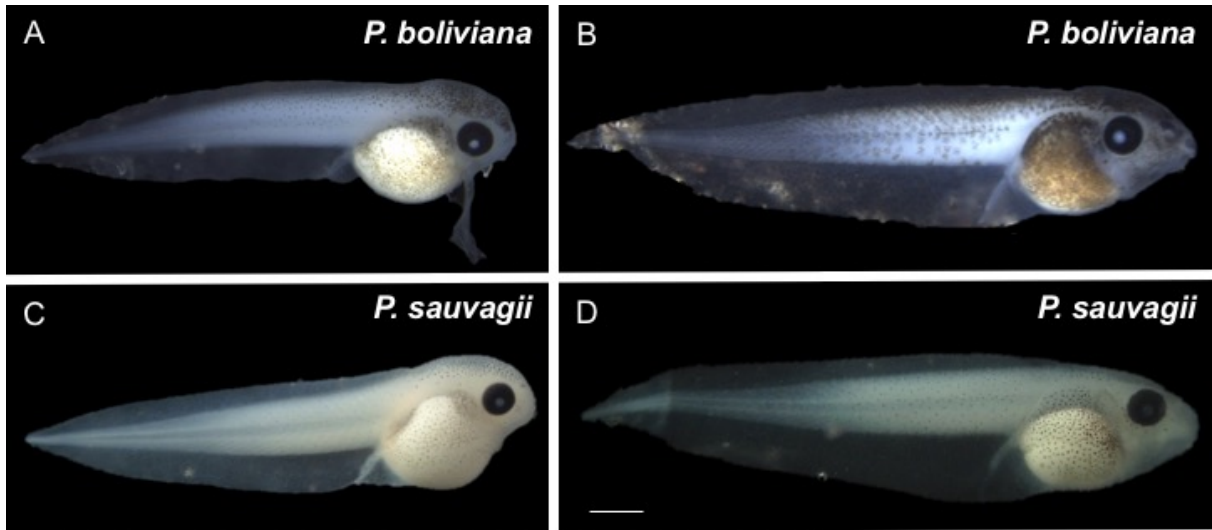


Figura 22. Vista lateral de embriones de *P. boliviana* y *P. sauvagii* eclosionados precozmente ante inundación (A y C) y embriones eclosionados espontáneamente dos días después (B y D). Escala: 1mm.

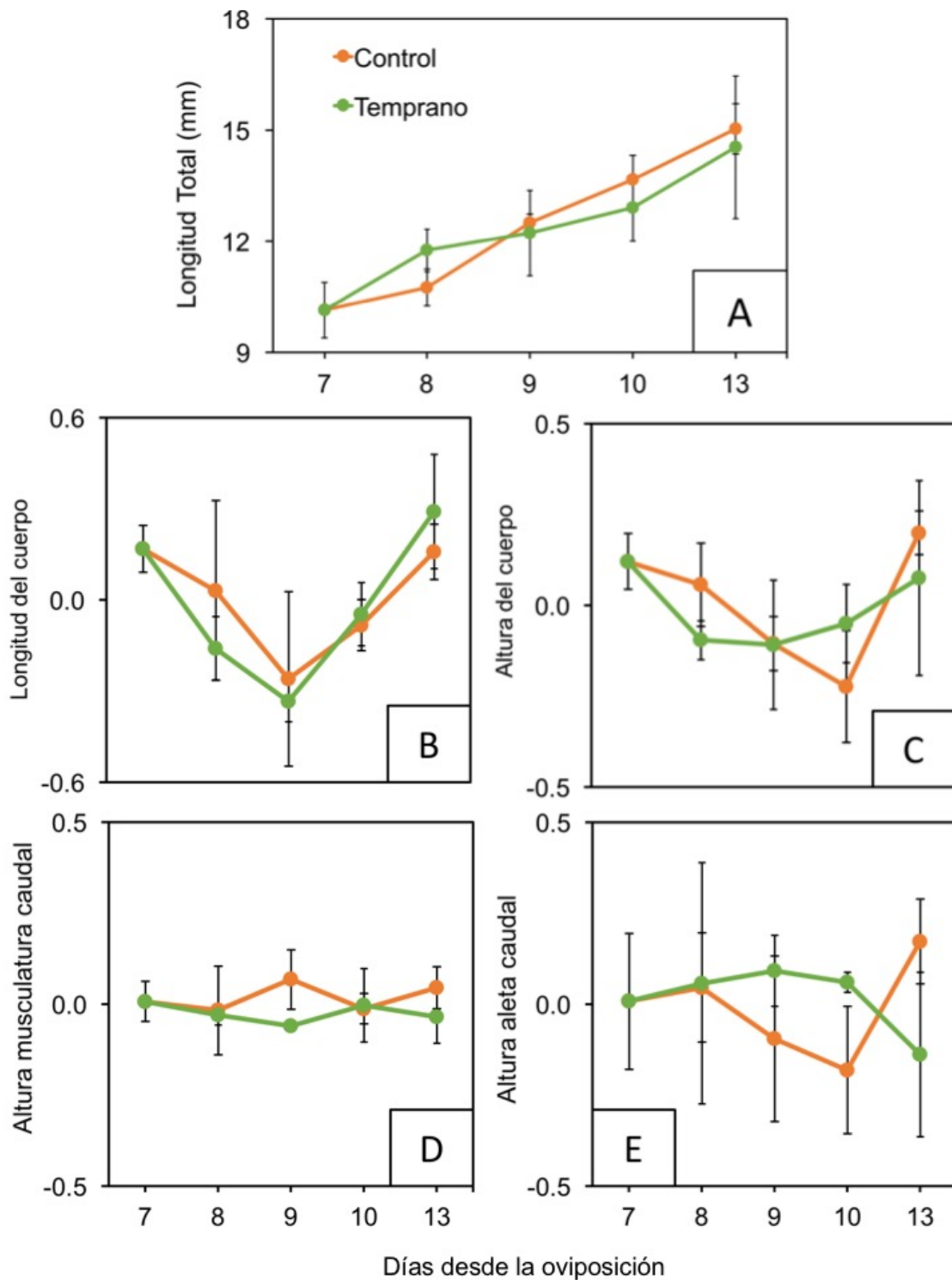


Figura 23. Medidas morfométricas de *P. boliviana* con diferentes edades de eclosión. Las medidas se registran desde el día de la eclosión temprana (día 7 del tratamiento temprano), y hasta que ocurre la eclosión espontánea (día 9 del control) la comparación entre embriones contemporáneos incluye especímenes fuera y dentro del huevo. (A) Longitud total; (B) Largo del cuerpo; (C) Altura del cuerpo; (D) Altura de la musculatura caudal; (E) Altura aleta caudal. Los valores corresponden a la media \pm SD de individuos provenientes de 1 $\frac{1}{2}$ nido (tratamiento temprano) y 2 $\frac{1}{2}$ nidos (control). Para las variables relacionadas a la forma se utilizaron los residuos de una regresión entre la variable y el largo total.

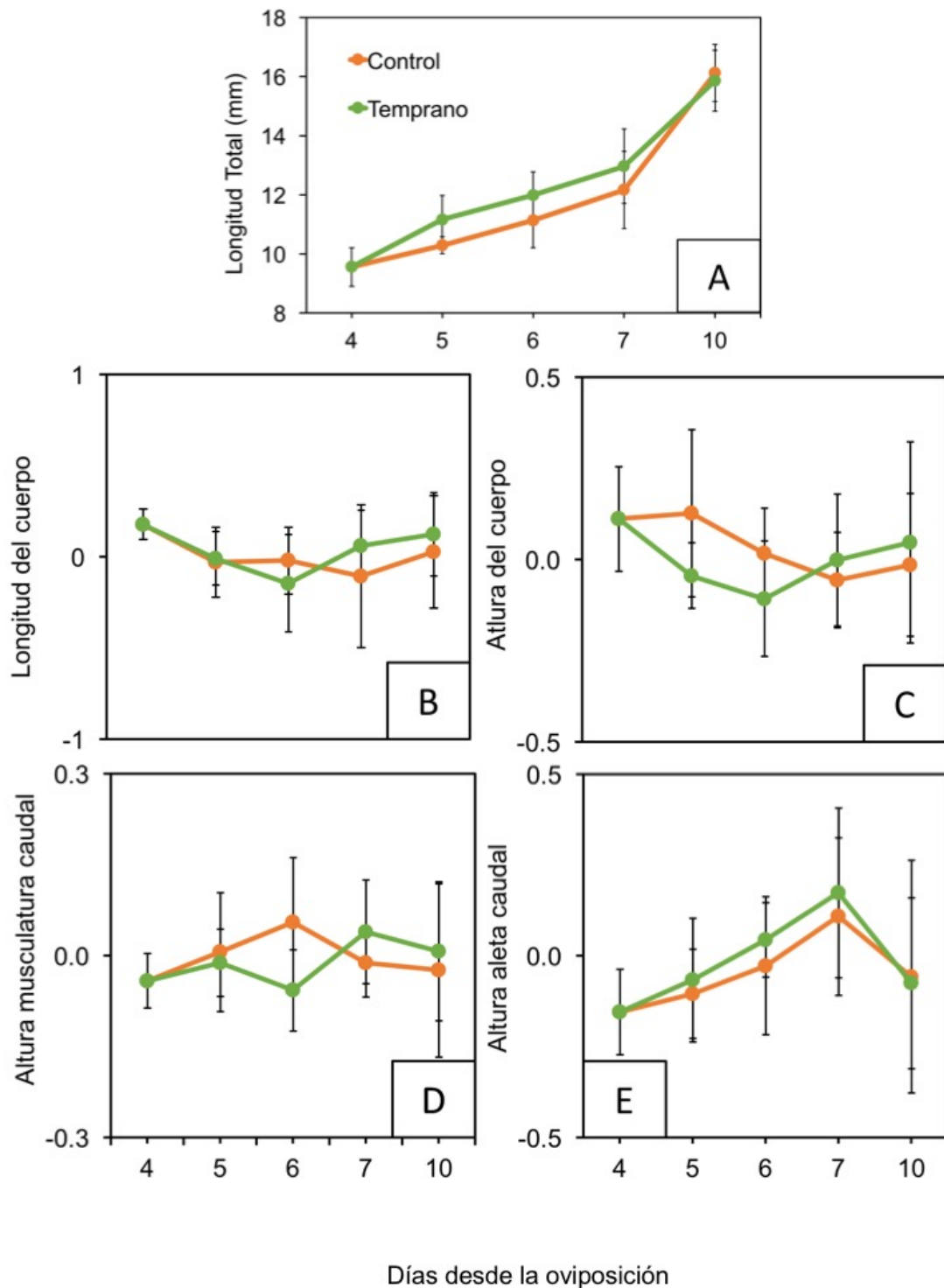


Figura 24. Medidas morfométricas de *P. sauvagii* con diferentes edades de eclosión. Las medidas se registran desde el primer día de la eclosión temprana (días 4 y 5 del tratamiento temprano), y hasta que ocurre la eclosión espontánea (días 6 y 7 del control) la comparación entre embriones contemporáneos incluye especímenes fuera y dentro del huevo. (A) Longitud total; (B) Largo del cuerpo; (C) Altura del cuerpo; (D) Altura de la musculatura caudal; (E) Altura aleta caudal. Los valores corresponden a la media \pm SD de individuos provenientes de 7 mitades de nido en cada tratamiento. Para las variables relacionadas a la forma se utilizó los residuos de una regresión entre la variable y el largo total.

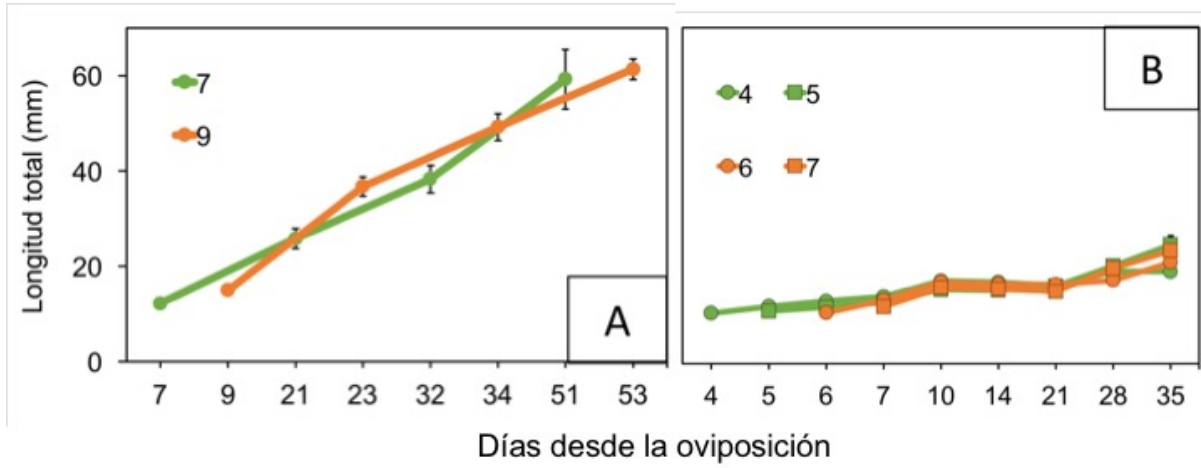


Figura 25. Crecimiento de *P. boliviana* (A) y *P. sauvagii* (B) con diferentes edades de eclosión. Los valores corresponden a la media \pm SD.

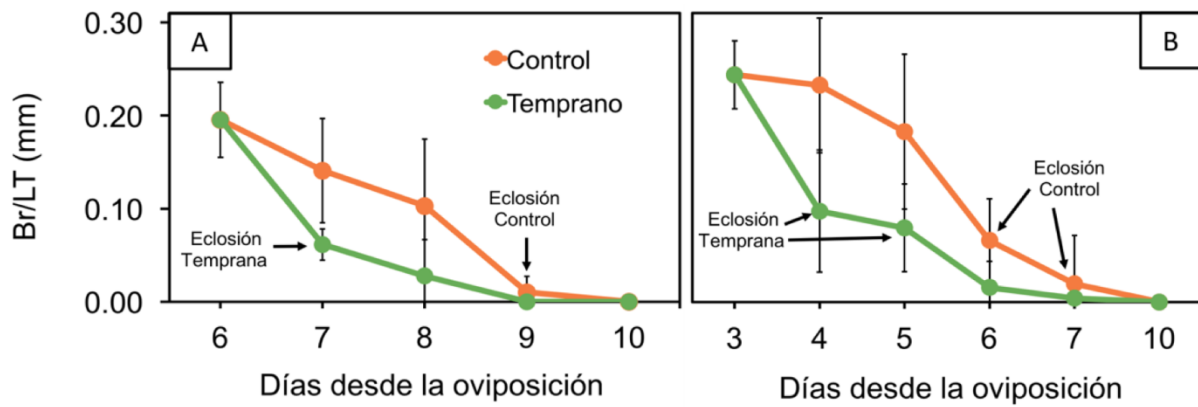


Figura 26. Desarrollo de las branquias (relación entre la longitud del eje mayor de las branquias - Br - y la longitud total del cuerpo - LT -) a lo largo del tiempo en individuos de *P. boliviana* (A) y *P. sauvagii* (B) con diferentes edades de eclosión. Los valores corresponden a la media \pm SD de individuos provenientes de 4 (A) y 7 (B) nidos.

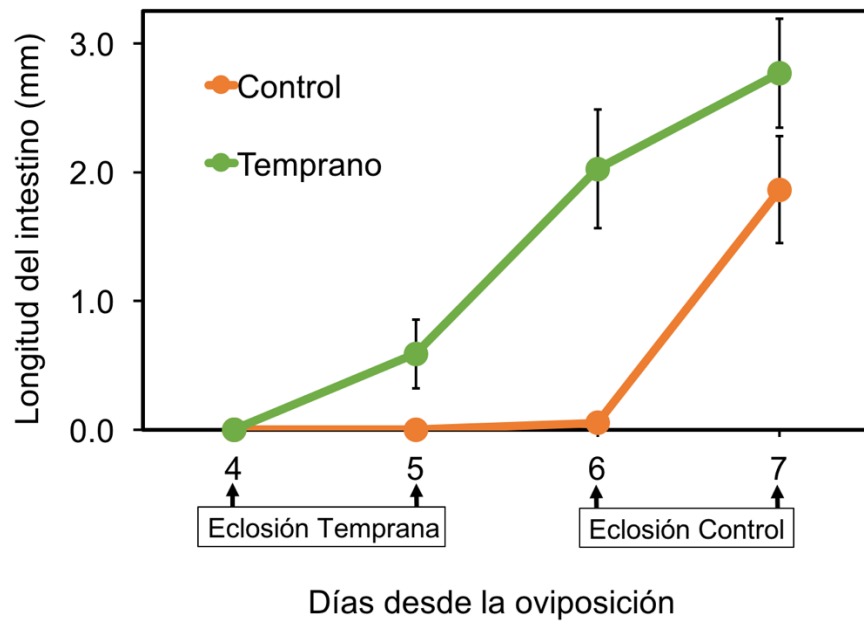


Figura 27. Longitud de las espiras del tracto digestivo a lo largo del tiempo en individuos de *P. sauvagii* control vs. individuos del tratamiento temprano. Los valores corresponden a la media \pm SE de individuos provenientes de 7 nidos. El análisis no pudo efectuarse para embriones de *P. boliviana* por resultar el material muy dañado durante las disecciones.

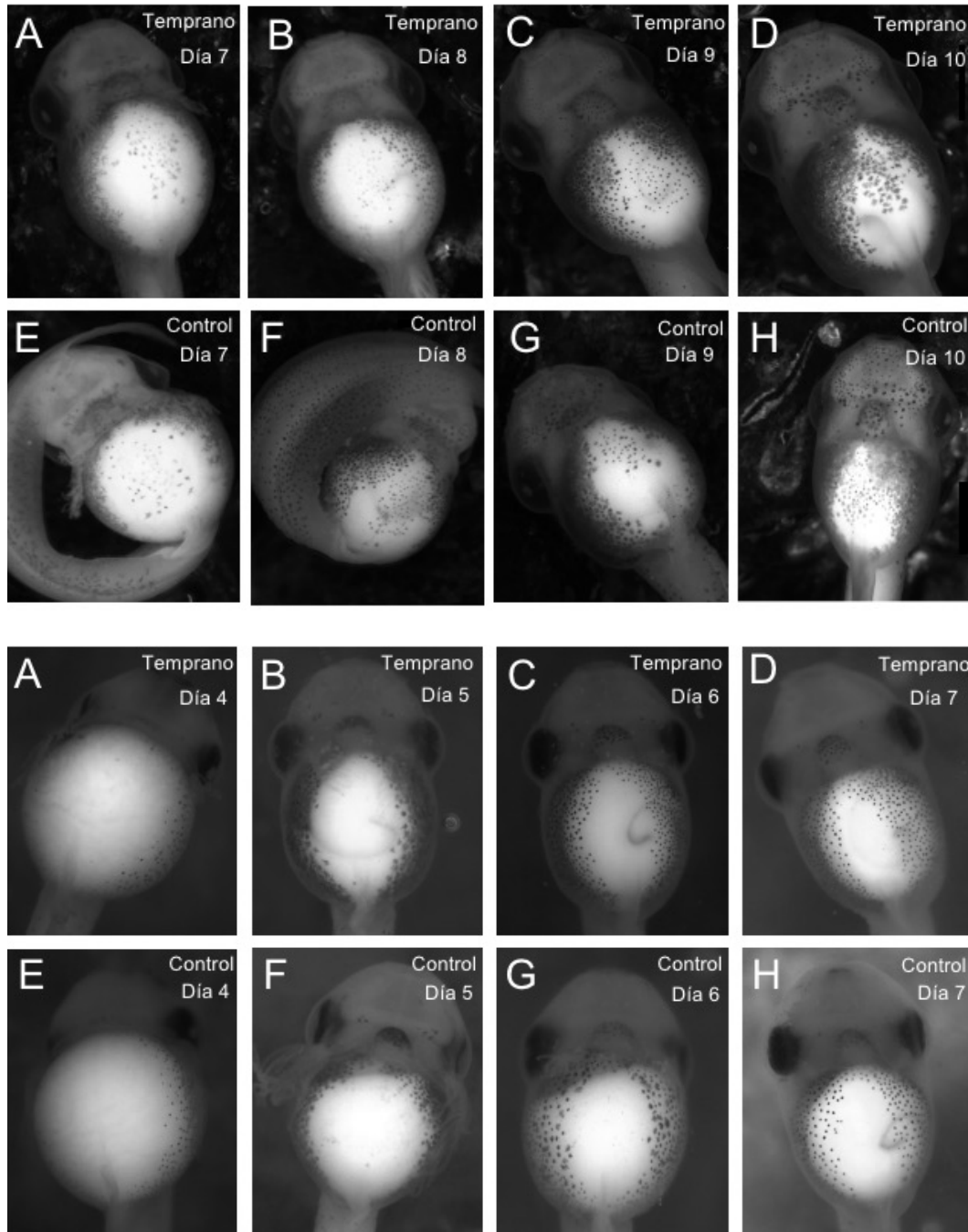


Figura 28. Desarrollo del tracto digestivo de *P. boliviana* (renglones superiores) y *P. sauvagii* (renglones inferiores). A-D ilustran los individuos eclosionados tempranamente a los días 7 y 4 respectivamente para cada especie, y E-H los individuos control eclosionados los días 9 y 7 respectivamente. Se muestran comparativamente embriones en los días 7–10 y 4–7 de cada cohorte. Nótese la diferenciación más temprana de las espiras en los embriones tratados.

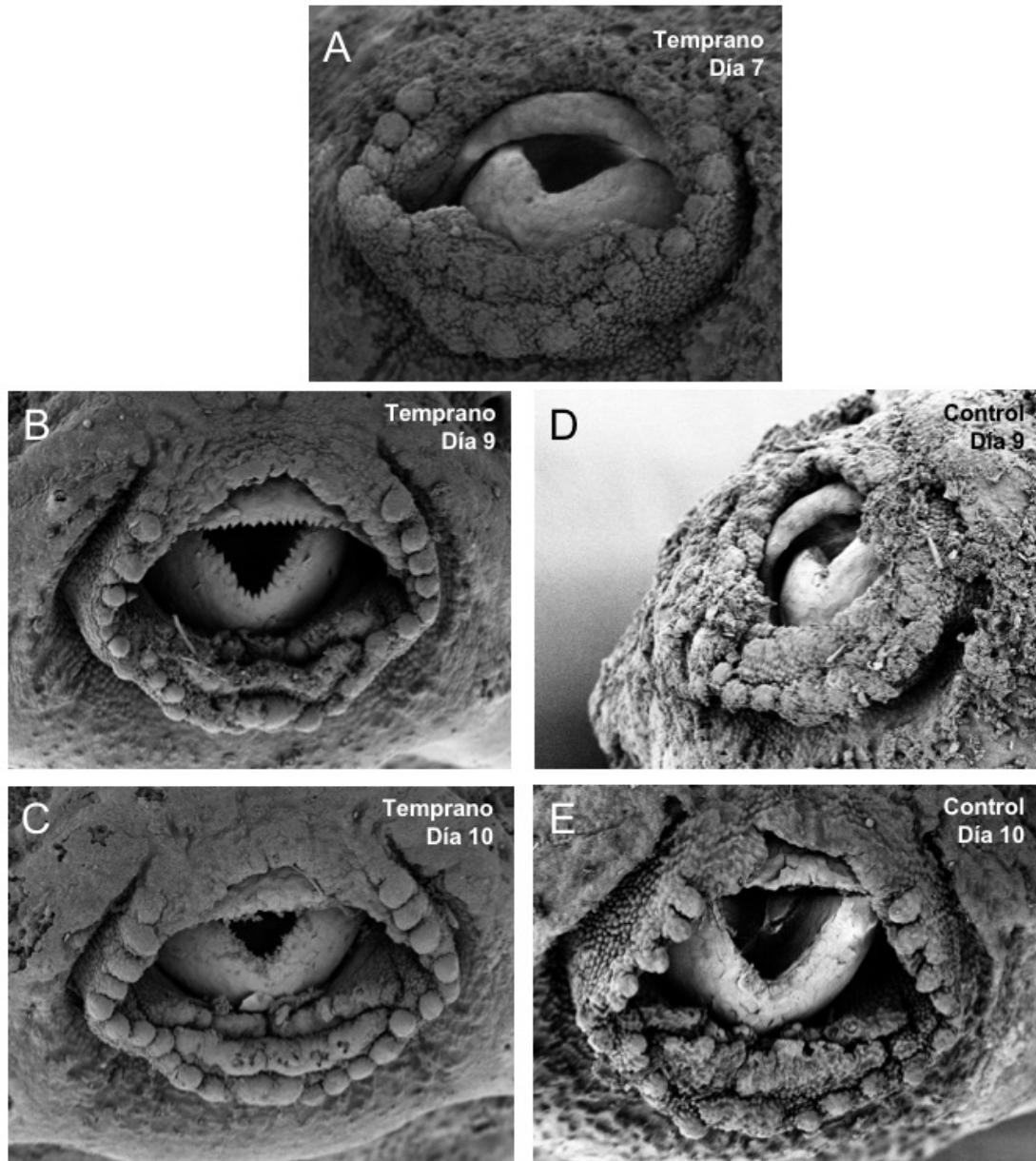


Figura 29. Microscopía electrónica de barrido del disco oral de individuos de *P. boliviana* con dos edades de eclosión diferente. Detalle del disco de un embrión que eclosionó tempranamente el día 7 (A). A la izquierda, disco oral de un embrión dos (B) y tres (C) días después de eclosionar. A la derecha, embriones control a los mismos tiempos, el día 9 de la eclosión normal (D), y un día post-eclosión (E). Nótese la diferenciación más rápida de partes del disco en embriones con eclosión precoz.

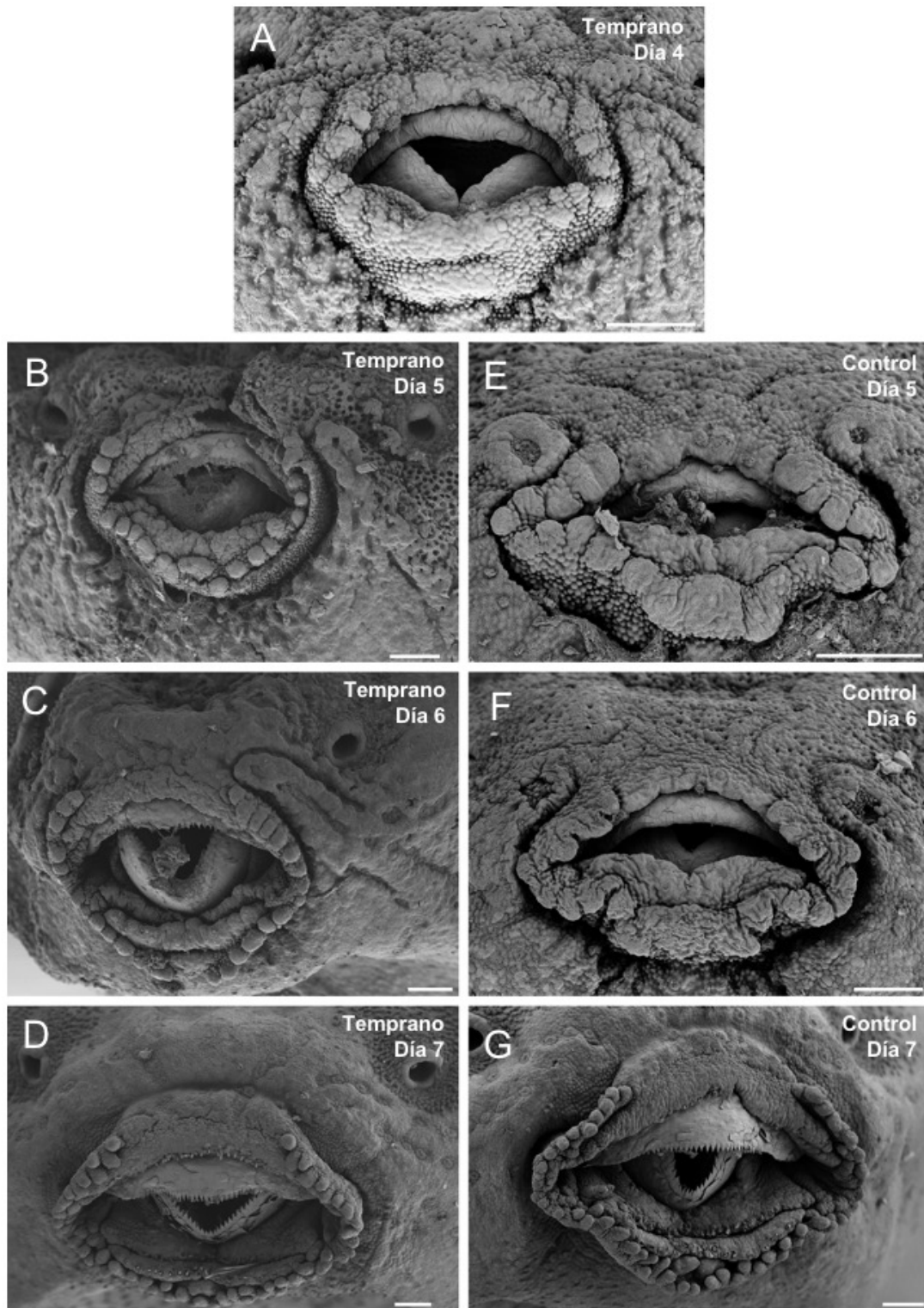


Figura 30. Desarrollo del disco oral en individuos de *P. sauvagii* con dos edades de eclosión diferente. Detalle del disco de un embrión que eclosionó tempranamente al 4° día (A). A la izquierda, disco oral de un embrión uno (B), dos (C) y tres (D) días después de eclosionar. A la derecha, embriones control a los mismos días 5 (E) y 6 (F) pero dentro del huevo, y día 7 durante la eclosión normal (G). Nótese la diferenciación más rápida de partes del disco en embriones con eclosión precoz.

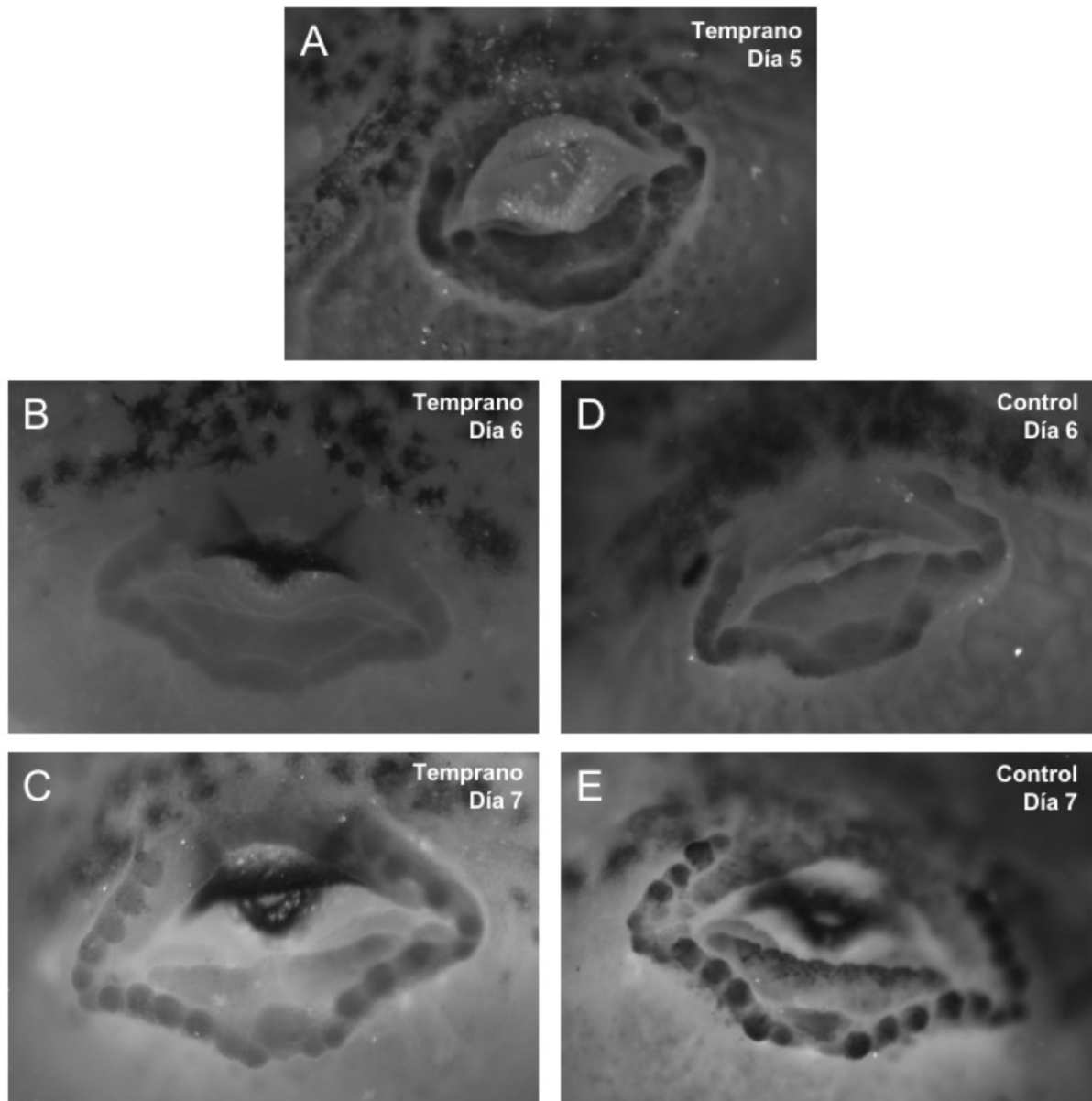


Figura 31. Desarrollo del disco oral en individuos de *P. sauvagii* con dos edades de eclosión diferente. Detalle del disco de un embrión que eclosionó tempranamente al 5° día (A). A la izquierda, disco oral de un embrión uno (B) y dos (C) días después de eclosionar. A la derecha, embriones control a los mismos días 6 (E) y 7(F) pero dentro del huevo. Si bien se observa una queratinización de vainas mandibulares más rápida en embriones con eclosión precoz, en breve el desarrollo se iguala tal que embriones con eclosión normal al 7° día y embriones que ya llevan 2 días en el agua presentan discos orales similares.

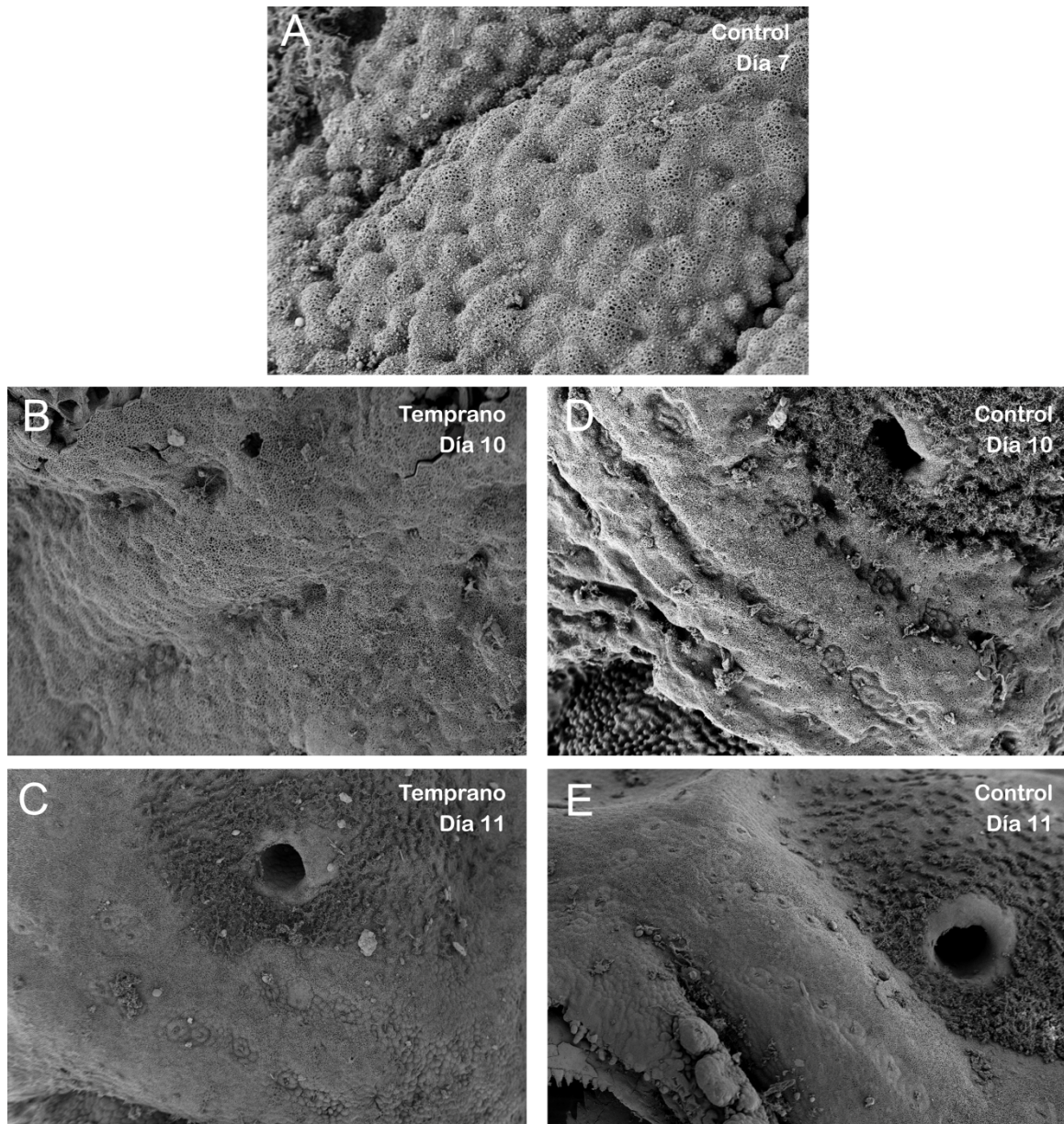


Figura 32. Microscopía electrónica de barrido de la región oral de individuos de *P. boliviana* con dos edades de eclosión diferente. Detalle de las células de eclosión y líneas laterales en un embrión pre-eclosión control (A). A la izquierda, neuromastos en desarrollo y células de eclosión en regresión ausentes en un embrión tres (B) y cuatro (C) días después de eclosionar tempranamente al día 7. A la derecha, embriones control a los mismos tiempos, un día luego de la eclosión normal (D), y dos días post-eclosión (E). Nótese la regresión más rápida de las células de eclosión y el desarrollo ligeramente más acelerado de los neuromastos, ya en grupos, en embriones con eclosión precoz.

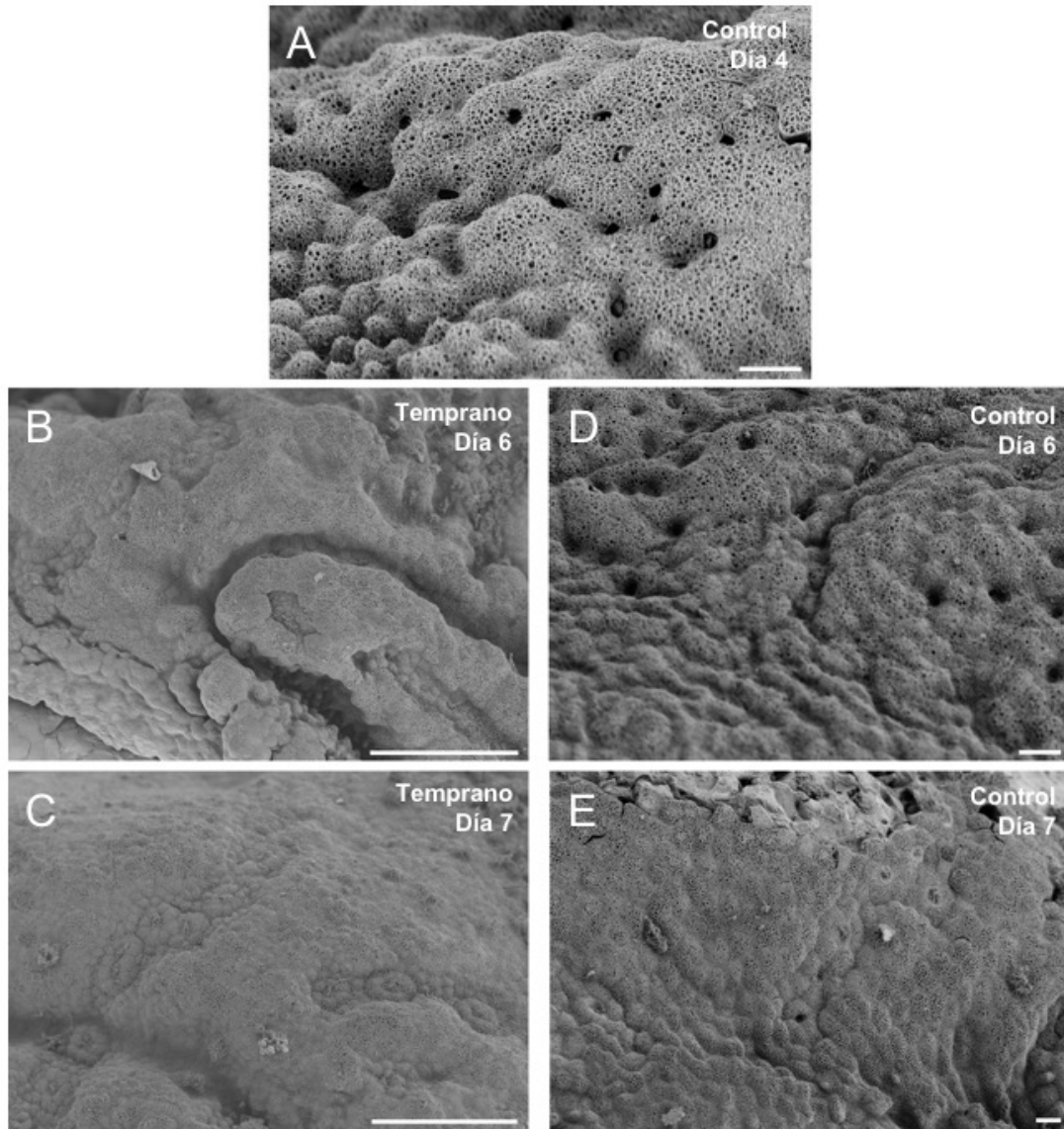


Figura 33. Microscopía electrónica de barrido de la región oral de individuos de *P. saugavii* con dos edades de eclosión diferente. Detalle de las células de eclosión en un embrión pre-eclosión control (A). A la izquierda, neuromastos en desarrollo y células de eclosión en regresión ausentes en un embrión dos (B) y tres (C) días después de eclosionar tempranamente al día 4. A la derecha, embriones control a los mismos tiempos, aún dentro del huevo (D) y al día de su eclosión normal (E). Nótese la regresión más rápida de las células de eclosión y el desarrollo ligeramente más acelerado de los neuromastos en embriones con eclosión precoz.

Tabla 4. Edad de eclosión en cada tratamiento para nidos de *Phyllomedusa boliviana*.

Nido	Tratamiento	
	Temprano	Control
1	7° día	9° día
2	7° día	9° día
3	7° día	9° día
4	7° día	9° día

Tabla 5. Edad de eclosión en cada tratamiento para nidos de *Phyllomedusa sauvagii*.

Nido	Tratamiento	
	Temprano	Control
1	5° día	7° día
2	4° día	No eclosionó
3	5° día	6° día
4	5° día	6° día
5	5° día	7° día
6	4° día	7° día
7	5° día	7° día

Tabla 6. Resultados del modelo lineal general mostrando los efectos de la edad de eclosión (normal o temprano) en las diferentes variables referidas al tamaño y a la forma a lo largo del experimento en embriones de *P. boliviana*. Se usó como covariable los días y en las variables referidas a la forma se usó también como covariable el largo total.

Modelos	β	EE	t	P
Largo total				
Intercept	5.361	0.949	5.644	<0.001
Tratamiento (temprano)	0.289	0.378	0.077	0.94
Día	0.748	0.096	7.780	<0.001
Longitud cuerpo				
Intercept	-0.616	0.363	-1.696	0.112
Tratamiento (temprano)	-0.068	0.074	-0.915	0.375
Día	0.074	0.035	2.098	0.054
Largo Total	0.293	0.045	6.391	<0.001
Altura cuerpo				
Intercept	0.297	0.315	0.946	0.356
Tratamiento (temprano)	-0.053	0.077	-0.699	0.494
Día	0.030	0.039	0.776	0.448
Largo Total	0.160	0.045	3.556	0.002
Altura musculatura caudal				
Intercept	0.432	0.152	2.850	0.011
Tratamiento (temprano)	-0.051	0.037	-1.361	0.190
Día	0.0168	0.019	0.898	0.381
Largo Total	0.060	0.0218	2.760	0.013
Altura aleta caudal				
Intercept	-0.584	0.332	-1.756	0.097
Tratamiento (temprano)	0.10	0.084	1.196	0.248
Día	0.097	0.052	1.855	0.082
Largo Total	0.197	0.056	3.479	0.003

Tabla 7. Resultados del modelo lineal general mostrando los efectos de la edad de eclosión (normal o temprano) en las diferentes variables referidas al tamaño y a la forma a lo largo del experimento en embriones de *P. sauvagii*. Se usó como covariable los días y en las variables referidas a la forma se usó también como covariable el largo total.

Modelos	β	EE	t	P
Largo total				
Intercept	4.982	0.558	8.922	<0.001
Tratamiento (temprano)	0.58	0.268	2.161	0.035
Día	1.061	0.074	14.310	<0.001
Longitud del cuerpo				
Intercept	-0.214	0.212	-1.001	0.318
Tratamiento (temprano)	0.093	0.067	1.388	0.171
Día	0.107	0.039	2.738	0.008
Largo Total	0.266	0.033	8.025	<0.001
Altura cuerpo				
Intercept	1.951	0.143	13.602	<0.001
Tratamiento (temprano)	-0.057	0.045	-1.271	0.209
Día	-0.014	0.026	-0.543	0.589
Largo Total	0.062	0.022	2.812	0.007
Altura musculatura caudal				
Intercept	0.834	0.087	9.584	<0.001
Tratamiento (temprano)	-0.011	0.027	-0.385	0.702
Día	0.0002	0.0161	0.017	0.986
Largo Total	0.0417	0.0136	3.075	0.003
Altura aleta caudal				
Intercept	0.306	0.200	1.527	0.133
Tratamiento (temprano)	0.056	0.063	0.892	0.376
Día	0.018	0.037	0.503	0.617
Largo Total	0.183	0.031	5.844	<0.001

CAPÍTULO IV

EFECTO ACUMULATIVO DE LA ECLOSIÓN PLÁSTICA

ANTECEDENTES

La etapa larval en anuros ha sido identificada como un período de crecimiento caracterizado por individuos altamente especializados en aprovechar recursos alimentarios de ambientes acuáticos (Wassersug, 1975). Durante esta etapa se producen cambios a lo largo del tiempo referidos al tamaño corporal (tasa de crecimiento) y a la forma (tasa de desarrollo; Altig y McDiarmid, 1999), ambos parámetros se encuentran disociados y varían dependiendo de las condiciones ambientales. El modelo de Wilbur y Collins (1973) explica cómo esta disociación les permite a las especies ajustar la tasa de desarrollo en respuesta a su tasa de crecimiento dependiendo de las condiciones ambientales. Si las condiciones son favorables, las larvas disminuyen su tasa de desarrollo y aumentan su tamaño corporal permitiendo un rápido crecimiento larval, metamorfoseando a un mayor tamaño corporal. Si las condiciones no son favorables, las larvas aceleran su tasa de desarrollo, metamorfosean a un tamaño corporal mínimo requerido para cada especie y el crecimiento continúa luego en la etapa terrestre. Modelos posteriores al de Wilbur y Collins (1973), proponen que las larvas solo pueden ajustar su desarrollo a las condiciones ambientales en una etapa temprana del período larvario, y no pueden responder a los cambios en las condiciones ambientales después de un umbral de edad específico (Travis, 1984; Reznick, 1990; Hensley, 1993; Leips y Travis, 1994).

Durante la etapa larval muchas especies de anuros se desarrollan en ambientes impredecibles marcados por una gran variabilidad ambiental. Bajo este escenario, la mayoría de las especies tienden a ajustar su fenotipo de manera adaptativa en respuesta a esta variabilidad ambiental, lo que se denomina plasticidad fenotípica (Stearns, 1989). Entre los factores ambientales que generan plasticidad fenotípica en larvas de anuros se incluye la temperatura (Reques y Tejedo, 1995), disponibilidad de alimento (Anholt y Werner, 1995), densidad larval (Semlitsch y Caldwell, 1982), hidroperíodo (Crump, 1989) y depredación (Bernard, 2004), entre otros. Las larvas responden a estos factores alterando su morfología (Relyea, 2001), comportamiento (Lawler, 1989) e historia de vida (Jackson y Semlitsch, 1993).

La depredación y la desecación de los charcos son probablemente dos de los factores ambientales que producen la mayor mortalidad durante esta etapa (Calef,

1973; Richter-Boix *et al.*, 2011). Es por esto, que en algunas especies de anuros, las larvas responden de manera adaptativa alterando su fenotipo ante éstos riesgos. Por ejemplo, larvas criadas en presencia de depredadores desarrollan mayor altura de aleta caudal y menor tamaño corporal y larvas con esta morfología sobreviven más a la depredación que individuos criados en ausencia de depredadores que son luego expuestos a depredación (Smith y Van Buskirk, 1995; McCollum y Van Buskirk, 1996; McCollum y Leimberger, 1997). El riesgo de depredación también altera el comportamiento de las larvas, que se alimentan menos a fin de evitar al depredador, afectando su crecimiento corporal (Lima y Dill, 1990; Ball y Baker, 1996). Con respecto al hidroperíodo, en estudios realizados en diferentes especies la respuesta al riesgo de desecación varía dependiendo del tipo de ambiente que habitan las larvas (Richter-Boix *et al.*, 2011). En general, se documentó que especies que habitan charcos efímeros y temporales con alto riesgo de desecación aceleran su tasa de desarrollo y la metamorfosis se produce más temprano y con un menor tamaño corporal (e.g., Newman, 1989). Mientras que en las especies que habitan ambientes permanentes, cuando se registró respuesta, ésta consistió en aumentar la tasa de desarrollo junto con la tasa de crecimiento, alcanzando la metamorfosis con tamaños corporales constantes (Richter-Boix *et al.*, 2011).

En organismos que presentan ciclos de vida complejos, como los anfibios, las respuestas plásticas que se dan temprano en la ontogenia pueden tener un efecto acumulativo, afectando fenotipos y respuestas plásticas en estadios posteriores (revisión en Pechenik, 2006). Por ejemplo, si la metamorfosis se ve retrasada, disminuye la supervivencia, la tasa de crecimiento de estadios post-metamórficos y el tamaño corporal medio de los adultos (Semlitsch *et al.*, 1988; Altwegg y Reyer, 2003). La plasticidad en la eclosión también produce efectos que se manifiestan en etapas posteriores, incluyendo la etapa larval (Warkentin, 1999; Vonesh y Bolker, 2005; Orizaola *et al.*, 2010; Touchon *et al.*, 2013; Touchon y Wojdak, 2014) como así también efectos que duran hasta la metamorfosis (Vonesh, 2005; Vonesh y Bolker, 2005; Touchon y Warkentin, 2010; Capellán y Nicieza, 2007; Touchon *et al.*, 2013; Touchon y Wojdak, 2014). Eclosionar antes afecta las interacciones de las larvas con sus depredadores. En los primeros estudios realizados en *A. callidryas*, se observó que las larvas con eclosión temprana son más vulnerables a los depredadores (Warkentin, 1995; 1999) y estudios posteriores mostraron que esa vulnerabilidad depende de la identidad del depredador (Touchon *et al.*, 2013; Willink *et al.*, 2013, Wodjak *et al.*, 2014). Además, las larvas de *A. callidryas* alteran su morfología corporal en respuesta a depredadores, y la naturaleza de esta respuesta depende de la edad

de eclosión (Touchon y Wojdak, 2014). Por su parte, hasta donde sabemos, no existen al momento trabajos en anfibios en donde se explore cómo influye la edad de eclosión en la respuesta de las larvas al riesgo de desecación.

Las especies de *Phyllomedusa* bajo estudio explotan diferentes ambientes en el área de estudio de esta Tesis. *Phyllomedusa boliviana* se reproduce generalmente en charcos permanentes, mientras que *P. sauvagii* puede además ser encontrada ocasionalmente en charcos temporarios. Como mencionamos en el capítulo anterior, las dos especies presentan plasticidad en el momento en el que se produce la eclosión. Por todo esto, resulta interesante explorar como la edad de eclosión afecta las respuestas plásticas ante riesgos como cambios en el hidroperíodo y presencia de señales de depredación.

En base a esto se proponen los siguientes objetivos:

- Investigar la influencia del riesgo de depredación y cambios en el hidroperíodo sobre el crecimiento y el desarrollo de larvas con diferentes edades de eclosión.
- Determinar si el riesgo de depredación y los cambios en el hidroperíodo modifican el tiempo y el tamaño en el que se inicia la metamorfosis en individuos con diferentes edades de eclosión.

Las hipótesis de trabajo proponen:

- La eclosión temprana supone una desventaja durante la vida larval, y embriones eclosionados precozmente son más susceptibles ante riesgos de depredación y desecación.
- Las condiciones de eclosión y su interacción con los factores de riesgo durante la vida larval repercuten finalmente en el tamaño y tiempo en que se inicia la metamorfosis.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las Figuras 34 y 37 muestran un resumen del diseño experimental seguido en este Capítulo. La información de cada nido consta en la Tabla 1 del Capítulo inicial. Si bien la propuesta original pretendía efectuar el mismo diseño en las dos especies estudiadas, problemas logísticos lo impidieron en un caso. Por eso, cuando es pertinente, se presentan los métodos diferenciados por especie.

Experimento de depredación

Phyllomedusa boliviana

Para determinar si larvas con diferentes edades de eclosión (temprana y normal) modifican su tamaño (crecimiento) y forma (desarrollo) en respuesta al riesgo de depredación, se realizó un diseño factorial completo 2x2 combinando la edad de eclosión y la señal de depredación. Se trabajó con 2 nidos criados durante el experimento del Capítulo anterior, uno inducido a eclosionar tempranamente por inundación, y un nido control. El conjunto de embriones eclosionados en cada uno fue dividido en dos, para ser sometido a tratamientos de señal de depredación. Resultó un diseño de 4 tratamientos combinando eclosión temprana (día 7) y eclosión espontánea (día 9) criados en ausencia de depredador (control) y bajo señales de depredación (depredador dentro de una bolsa). El diseño se replicó 4 veces (Tabla 8; Fig. 34). Diez larvas de cada edad de eclosión seleccionadas al azar se colocaron en mesocosmos con iguales condiciones experimentales. Los mesocosmos fueron llenados con agua corriente decolorificada y colocados al aire libre en una plataforma de cemento de aproximadamente 30 m² emplazado en un área parqueada sin cobertura arbórea (Fig. 35). Se asignó cada mesocosmos aleatoriamente a los 4 posibles tratamientos mencionados anteriormente (Tabla 8). Los depredadores usados en este experimento fueron náyades de Odonata (Familia Aeshnidae, sp. no identificada) (Fig. 36) que fueron colectadas en charcos naturales donde coexisten habitualmente con las larvas de *Phyllomedusa* bajo estudio. Los depredadores fueron colocados dentro de pequeñas bolsas de red realizadas con tela mosquitera para evitar que pudieran atacar, dañar o consumir las larvas de *Phyllomedusa*. De esta manera, las larvas sólo estuvieron expuestas a señales visuales y químicas de depredación. Para estandarizar las condiciones dentro de cada mesocosmos, en todas las réplicas colocaron bolsas de tela mosquitera independientemente de que se trate de tratamientos con o sin depredadores. Los renacuajos fueron alimentados 3 veces a la semana con una mezcla de “pellets” (alimento para conejos) y alimento para peces previamente triturados. Los depredadores fueron alimentados dentro de las mismas bolsas de red, 3 veces a la semana con renacuajos de la misma especie bajo estudio. La superficie de los mesocosmos fue cubiertas con tela mosquitera para evitar la entrada y salida de cualquier organismo.

Phyllomedusa sauvagii

Por inconvenientes logísticos (duración prolongada de los experimentos en curso, problemas de espacio), las pruebas con *P. sauvagii* se postergaron hasta la última temporada de muestreo. Al momento en que los depredadores comenzaron a

aparecer en los charcos, lamentablemente no pudimos encontrar nidos recientes para inducir la eclosión y completar el diseño factorial. Por esto, se adaptó el experimento a un tratamiento con dos niveles, con y sin señales de depredación, sólo efectuado sobre larvas eclosionadas espontáneamente. Los detalles metodológicos son como en el caso anterior, pero se trabajó con 3 nidos y seis réplicas del diseño (Fig. 34).

Experimento de hidroperíodo

Se trabajó con 6 nuevos nidos de *P. boliviana* y 5 de *P. sauvagii*, que se analizaron en experimentos durante temporadas diferentes (Fig. 37). De los 6 nidos de *P. boliviana*, 3 fueron utilizados para el tratamiento control y 3 para el tratamiento temprano. Se inundó los nidos del tratamiento temprano al comienzo del período plástico (día 7), mientras que los nidos control no fueron disturbados para que eclosionen de manera espontánea (día 9). En *P. sauvagii*, 1 nido fue íntegramente criado en condiciones normales (control) y los otros 4 fueron inundados al comienzo del período plástico para inducir la eclosión temprana. Se decidió realizar este diseño debido a que los nidos se encontraban en diferentes momentos del desarrollo y de esta manera se logró comenzar con ambos tratamientos (control y temprano) al mismo tiempo.

El diseño experimental también incluyó un diseño factorial completo 2x2 para las dos especies. El conjunto de embriones eclosionados a diferentes edades fue dividido en dos, para ser sometido a tratamientos de hidroperíodo decreciente (= desecación). Resultó un diseño de 4 tratamientos combinando eclosión temprana (días 7 y 5 días para *P. boliviana* y *P. sauvagii* respectivamente) y eclosión espontánea (días 9 y 7) criados en hidroperíodo constante (control) y decreciente. El diseño se replicó 5 veces (Tabla 9; Fig. 37). Diez larvas de cada edad de eclosión fueron colocadas en bandejas con iguales condiciones experimentales iniciales. Las bandejas de 30 x 22 x 7 cm se llenaron con 3000 ml de agua corriente de clorificada y se colocaron en una misma mesa dentro de una habitación cerrada con ventanas que sólo permitían el paso de la luz (Fig. 38). Cada bandeja fue asignada aleatoriamente a los 4 tratamientos posibles (Tabla 9). En las bandejas control, el nivel de agua se mantuvo constante durante todo el experimento. Por su parte, las bandejas con hidroperíodo decreciente contuvieron los 3 litros de agua iniciales, y para simular la desecación natural de los charcos, se extrajo sistemáticamente 200 ml cada 7 días las primeras 6 semanas y seguidamente cada 14 días hasta llegar a un 1 litro al final del experimento. Este diseño de extracción de agua se realizó con el fin de extraer agua paulatinamente durante toda la etapa larval, teniendo en cuenta la duración aproximada de ésta etapa en las especies bajo estudio. Para mantener y controlar el

nivel de agua se colocó una cinta adhesiva en la parte interior de cada bandeja indicando el nivel de agua. Las bandejas fueron supervisadas cada 2 días y se agregó agua en el caso de que la cantidad de agua disminuyera por evaporación. Los renacuajos fueron alimentados 3 veces a la semana con una mezcla de “pellets” (alimento para conejos) y alimento para peces previamente triturados. Además, se reemplazó por completo el agua de todas las bandejas cada 2 semanas. El reemplazo del agua fue realizado extrayendo cuidadosamente las larvas primero y colocándolas en un recipiente aparte con agua limpia de clorificada, luego se llenó las bandejas con agua limpia de clorificada hasta el nivel que correspondía dependiendo del tratamiento. Las bandejas fueron cubiertas con tela mosquitera para evitar la entrada y salida de cualquier organismo.

Crecimiento y desarrollo

Para registrar el crecimiento/tamaño corporal (longitud total) y aspectos del desarrollo/forma (resto de las variables morfológicas) durante los experimentos, las larvas fueron capturadas cada 9–36 días y fotografiadas en vista lateral junto con una escala de referencia. Se trató de tomar las fotografías lo más rápido posible tratando de que la manipulación sea la menor posible para no intervenir en el normal desarrollo de las larvas. A partir de las fotografías tomadas, se usó el programa ImageJ para medir la longitud del cuerpo, longitud de la cola, altura máxima de la musculatura caudal y altura máxima de la aleta caudal (Fig. 21 del Capítulo III). Estas medidas fueron tomadas hasta el estadio 42, coincidiendo con el momento en el que emergen los miembros anteriores (Gosner 1960). El número de larvas que se midió en los diferentes momentos de los experimentos varió de acuerdo a la mortalidad ocurrida en las diferentes bandejas.

Metamorfosis

Los renacuajos en las bandejas fueron criados hasta la metamorfosis. En las etapas finales del experimento se controló diariamente cada mesocosmos/bandeja, procediendo a extraer a los individuos que alcanzaban el estadio 42. Cada metamorfo fue colocado en un pequeño recipiente individual cerrado con una base de papel húmedo, y se lo retuvo allí hasta la reabsorción completa de la cola (Fig. 39). Se registró la duración de la etapa larval (en días hasta el estadio 42), y el tamaño del cuerpo (LHC, largo hocico cloaca) y peso de los metamorfos. Debido a la alta mortalidad de los individuos metamórficos, que se intensifica hacia el final de la metamorfosis (estadio 46), los datos de LHC y peso de metamorfos incluyen individuos desde el estadio 42 al 46.

Análisis estadístico

Todo los análisis fueron realizados en R v. 3.5.1 (R Development Core Team, 2018). El tamaño corporal (longitud total) y la morfología externa (resto de las variables morfométricas) fueron analizados mediante modelos lineales generales mixtos (MLM) para cada día a lo largo del experimento. Se incluyó como factor fijo la edad de eclosión, el tratamiento (depredador o hidroperíodo) y la interacción entre ambos. Como efecto aleatorio se incluyó la identidad del mesocosmos/bandeja. En el caso de las variables relacionadas a la forma corporal, además, se tuvo en cuenta el largo total como covariable, tal como sugiere McCoy *et al.* (2006). El tamaño (peso y LHC) alcanzado en el momento de la metamorfosis también fue analizado mediante MLM. En todos los casos se comprobaron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza sobre los valores reales mediante los test de Shapiro Wilks y Levene respectivamente. Por su parte, debido a que los datos no cumplieron con los supuestos de normalidad, la duración de la etapa larval en los experimentos de hidroperíodo fue analizada mediante modelos lineales generalizados mixtos (MLGM) con una distribución del error Poisson y enlace logit. En el experimento de hidroperíodo con larvas de *P. sauvagii* debido al bajo número de metamorfos se realizó un test no paramétrico Mann-Whitney (comparación de medias de muestras independientes) para datos de duración de la etapa larval y tamaño de metamorfosis. Los resultados se sintetizan como curvas de crecimiento, pero a diferencia de los gráficos del Capítulo III, en este caso el eje X muestra la progresión de días posteclosión, lo que implica que los especímenes comparados en cada categoría no tienen la misma edad sino el mismo tiempo en el agua.

RESULTADOS

Experimento de depredación

El experimento de depredación con larvas de *P. boliviana* duró 81 días desde el 5/2/18 hasta el 27/4/18. La mortalidad total de larvas al final del experimento fue del 41,9% (n=67), se resumen los valores para cada tratamiento en la Tabla 10. Por su parte, el experimento de depredación con larvas de *P. sauvagii* duró 78 días desde el 9/2/16 hasta el 26/4/16. Al final del experimento, el porcentaje de larvas muertas en el tratamiento con depredador fue del 36,7% (n=22), mientras que en el Control fue del 56,7% (n=34).

Se realizaron mediciones en 608 (*P. boliviana*) y en 492 (*P. sauvagii*) fotos de individuos a lo largo de todo el experimento.

*Crecimiento y desarrollo**Phyllomedusa boliviana*

Al comienzo del experimento, en el día 0, el tamaño corporal (longitud total) de las larvas se ve afectado por la edad de eclosión (MLM, $t = -17,46$, $P = <0,001$; Tabla 11) presentando las larvas del tratamiento temprano un menor tamaño comparado con las larvas control (Fig. 40A). En el día 14 y 25 se observa un efecto de la edad de eclosión, la presencia de depredadores y de la interacción entre ambos factores (ver Tabla 11; Fig. 34A). La interacción nos indica que ambos factores son aditivos, siendo positiva para ambos días (MLM, día 14, $t = 6,64$, $P = <0,001$; día 25, $t = 2,85$, $P = 0,01$; Tabla 11) por lo que la suma de los efectos actuando juntos es mayor que la suma de los efectos actuando por separado (potenciación). En nuestro estudio, presentar una eclosión temprana potencia el efecto de la presencia de señales de depredación, por lo que las larvas crecen menos en presencia de depredadores (Fig. 40A). Por último, en el día 44, no se encontraron diferencias en el tamaño de las larvas entre tratamientos (Tabla 11; Fig. 40A).

Con respecto a la morfología externa, los resultados muestran que al comienzo del experimento, en el día 0, las larvas con eclosión temprana presentan mayor altura del cuerpo comparada con larvas con eclosión normal (MLM, $t = 2,86$, $P = 0,01$; Tabla 12; Fig. 40C). En el día 14, no se encontró efecto de la edad de eclosión, de las señales de depredación ni de la interacción entre ambas para ninguna de las variables relacionadas a la forma corporal (Tabla 13, Figs. 40B-E). En el día 25, por su parte, los resultados muestran que la edad de eclosión afecta la altura de la musculatura caudal (MLM, $t = 2,72$, $P = 0,02$; Tabla 14; Fig. 40D) y la altura de la aleta caudal (MLM, $t = 2,63$, $P = 0,02$; Tabla 14; Fig. 40E), presentando las larvas con eclosión temprana mayores valores comparadas con larvas de eclosión normal. En el día 44, la eclosión temprana y la presencia de señales de depredación aumentan la altura de la musculatura caudal (MLM, eclosión temprana, $t = 3,35$, $P = 0,01$; depredador, $t = 2,19$, $P = 0,05$; Tabla 15; Fig. 40D) y la altura de la aleta caudal (MLM, eclosión temprana, $t = 3,54$, $P < 0,01$; depredación, $t = 2,44$, $P < 0,05$; Tabla 15; Fig. 40E) de las larvas de ambas edades de eclosión.

Phyllomedusa sauvagii

Los resultados obtenidos para larvas de *P. sauvagii* indican que las señales de depredación afectan significativamente el tamaño sólo en el día 21 (MLM, $t = -3,58$, $P = 0,01$; Tabla 16; Fig. 41A), disminuyendo el tamaño en larvas con señales de depredación.

Con respecto a las variables referidas a la forma, en el día 0 del experimento, como era de esperar, no encontramos diferencias entre larvas con y sin señales de depredación (Tabla 17, Figs. 41B-E). En el día 21, 34 y 48 hay un efecto de las señales de depredación sobre la altura de la musculatura caudal (MLM, Día 21: $t = 3,40$, $P = <0,01$, Tabla 18; Día 37: $t = 2,53$, $P <0,05$; Tabla 19; Día 48: $t = 5,27$, $P <0,01$; Tabla 20; Fig. 41D), presentando las larvas con depredadores mayores valores referidos a esta variable.

Metamorfosis

Phyllomedusa boliviana

En el experimento con larvas de *P. boliviana* el 58,1% ($n=93$) de los individuos lograron alcanzar la metamorfosis, se resumen los valores para cada tratamiento en la Tabla 10.

Los resultados muestran un efecto positivo de la edad de eclosión (MLM, $t = 4,14$, $P <0,01$; Tabla 21), de la presencia señales de depredación (MLM, $t = 3,40$, $P <0,01$; Tabla 21) y una interacción negativa entre ambos factores sobre la duración de la etapa larval (MLM, edad de eclosión*depredación, $t = -2,28$, $P <0,05$; Tabla 21; Fig. 42A). Esto significa que el aumento de la duración de la etapa larval en larvas expuestas a señales de depredación se ve inhibido en larvas con edad de eclosión temprana. Por su parte, la longitud hocico cloaca (LHC) es mayor en larvas con edad de eclosión temprana (MLM, $t = 2,49$, $P <0,05$; Tabla 19; Fig. 42C) y en presencia de depredadores (MLM, $t = 2,28$, $P <0,05$; Tabla 21; Fig. 42C).

Phyllomedusa sauvagii

Del total de individuos de *P. sauvagii* que se encontraban en los mesocosmos con depredadores el 63,3% ($n=38$) alcanzó la metamorfosis, mientras que para los mesocosmos sin depredadores el porcentaje fue del 43,3% ($n=26$).

No se encontraron diferencias entre larvas de *P. sauvagii* con y sin señales de depredación en la duración de la etapa larval (MLGM, $z = 1,45$; $P = 0,15$; Tabla 22; Fig. 42D) y en el tamaño (peso, MLM, $t = 1,69$, $P = 0,12$; Fig. 42E y longitud hocico-cloaca, MLM, $t = 1,14$, $P = 0,28$; Tabla 23; Fig. 42F) en el que se produce la metamorfosis.

Experimento de hidroperíodo

El experimento de hidroperíodo con larvas de *P. boliviana* duró 136 días desde el 19/12/16 para el tratamiento temprano y desde el 21/12/16 para el tratamiento tardío hasta el 5/5/17. Por su parte, el experimento con larvas de *P. sauvagii* tuvo una

duración de 132 días desde el 12/12/17 hasta el 23/4/18. La mortalidad de larvas al final del experimento en las dos especies por tratamiento se resume en la Tabla 24. Se destaca la alta mortalidad de larvas en el experimento de *P. sauvagii* (95,5%).

Se realizaron mediciones en 977 (*P. boliviana*) y en 638 (*P. sauvagii*) fotos de individuos a lo largo de todo el experimento.

Crecimiento y desarrollo

Phyllomedusa boliviana

En el experimento realizado en larvas de *P. boliviana*, encontramos en el día 0, un efecto de la edad de eclosión en el tamaño (MLM, $t = -5,69$, $P < 0,01$, Tabla 25, Fig. 43A) siendo las larvas con edad eclosión temprana más pequeñas que las de eclosión normal. Esta tendencia se revierte para los días 9 (MLM, $t = 5,45$, $P < 0,001$, Fig. 43A) y 23 (MLM, $t = 3,64$, $P = 0,002$; Fig. 43A), en donde se observa que las larvas con eclosión temprana son más grandes que las larvas control. En el resto de los días, no se encontraron diferencias respecto al tamaño de las larvas.

Con respecto a las variables referidas a las formas, en el día 0, las larvas de eclosión temprana presentan significativamente mayor longitud (MLM, $t = 2,54$, $P < 0,05$, Tabla 26, Fig. 43B) y altura del cuerpo (MLM, $t = 8,89$, $P < 0,001$, Tabla 26, Fig. 43C). En el resto de los días no se observa una tendencia clara respecto al efecto de la edad de eclosión e hidropériodo sobre las variables referidas a la forma (Tablas 27-29). Si bien se obtuvieron valores significativos, estos efectos no se mantienen en el tiempo, excepto para larvas con eclosión temprana que presentan una menor musculatura caudal el día 23 (MLM, $t = -4,64$, $P < 0,001$, Tabla 28, Fig. 43B) y esto se mantiene hasta el día 51 (MLM, $t = -4,27$, $P < 0,001$, Tabla 29, Fig. 43B).

Phyllomedusa sauvagii

En el experimento realizado con larvas de *P. sauvagii*, los resultados muestran que en el día 0, hay un efecto de la edad de eclosión en el tamaño (MLM, $t = -3,03$, $P = 0,008$, Tabla 30, Fig. 44A) siendo las larvas con edad eclosión temprana más pequeñas que las de eclosión normal. En el día 36, las larvas con eclosión temprana siguen siendo más pequeñas (MLM, $t = -3,09$, $P = 0,007$, Tabla 30). Además, se observa un efecto del hidropériodo (MLM, $t = -3,75$, $P = 0,002$, Tabla 30), en donde las larvas expuestas a hidropériodo decreciente también presentaron menores tamaños. En el día 64, el efecto del hidropériodo mencionado anteriormente se mantiene (MLM, $t = -2,36$, $P = < 0,05$, Tabla 30). En el día 91, nuevamente las larvas de edad de eclosión temprana son más pequeñas que las de eclosión normal (MLM, $t = -2,79$, $P = < 0,05$, Tabla 30). Además se observa un efecto de la interacción entre edad de

eclosión y el hidroperíodo los días 36 (MLM, $t = 2,19$, $P = 0,04$, Tabla 30) y 91 del experimento (MLM, $t = 2,38$, $P = 0,03$, Tabla 30).

Con respecto a las variables referidas a las formas, en el día 0, las larvas de eclosión temprana presentan significativamente mayor largo del cuerpo (MLM, $t = 2,45$, $P = <0,05$, Tabla 31, Fig. 44B) y altura de la aleta caudal (MLM, $t = 7,33$, $P = <0,001$, Tabla 31, Fig. 44E). En el resto de los días, al igual que con las larvas de *P. boliviana*, no se observa una tendencia clara respecto al efecto de la edad de eclosión e hidroperíodo sobre las variables referidas a la forma (Tablas 31–34). Solo en el día 91, el hidroperíodo decreciente produce un aumento de todas las variables del cuerpo (Tabla 34. Figs. 44B-E), y una interacción negativa con el largo del cuerpo de larvas eclosionadas tempranamente (MLM, $t = -2,85$, $P <0,05$, Tabla 35).

Metamorfosis

Phyllomedusa boliviana

En el experimento con larvas de *P. boliviana* el 36,5% ($n=73$) de los individuos lograron alcanzar la metamorfosis, se resume los valores para cada tratamiento en la Tabla 23.

No se encontraron efectos del hidroperíodo, la edad de eclosión ni en la interacción de ambos factores en la duración de la etapa larval (Fig. 45A), peso (Tabla 36, Fig. 44B) y LHC (Tabla 36, Fig. 45C) en larvas de *P. boliviana* (Tabla 36).

Phyllomedusa sauvagii

En el experimento con *P. sauvagii* de un total de 200 individuos, sólo 9 individuos alcanzaron la metamorfosis.

No se encontraron diferencias en la duración de la etapa larval (Mann-Whitney; $W = 14,0$, $P = 0,19$, Fig. 41D), LHC (Mann-Whitney; $W = 3,00$, $P = 0,33$) ni en el peso (Mann Whitney; $W = 3,00$, $P = 0,33$) en larvas expuestas a diferentes hidroperíodo. No se pudo realizar análisis en los tratamientos con diferentes edades de eclosión dado que no hubo metamorfosis en el tratamiento eclosión normal, hidroperíodo decreciente (Tabla 23).

DISCUSIÓN

La discusión de estos resultados se presenta de manera integrada con las siguientes, en el Capítulo 5.

FIGURAS Y TABLAS

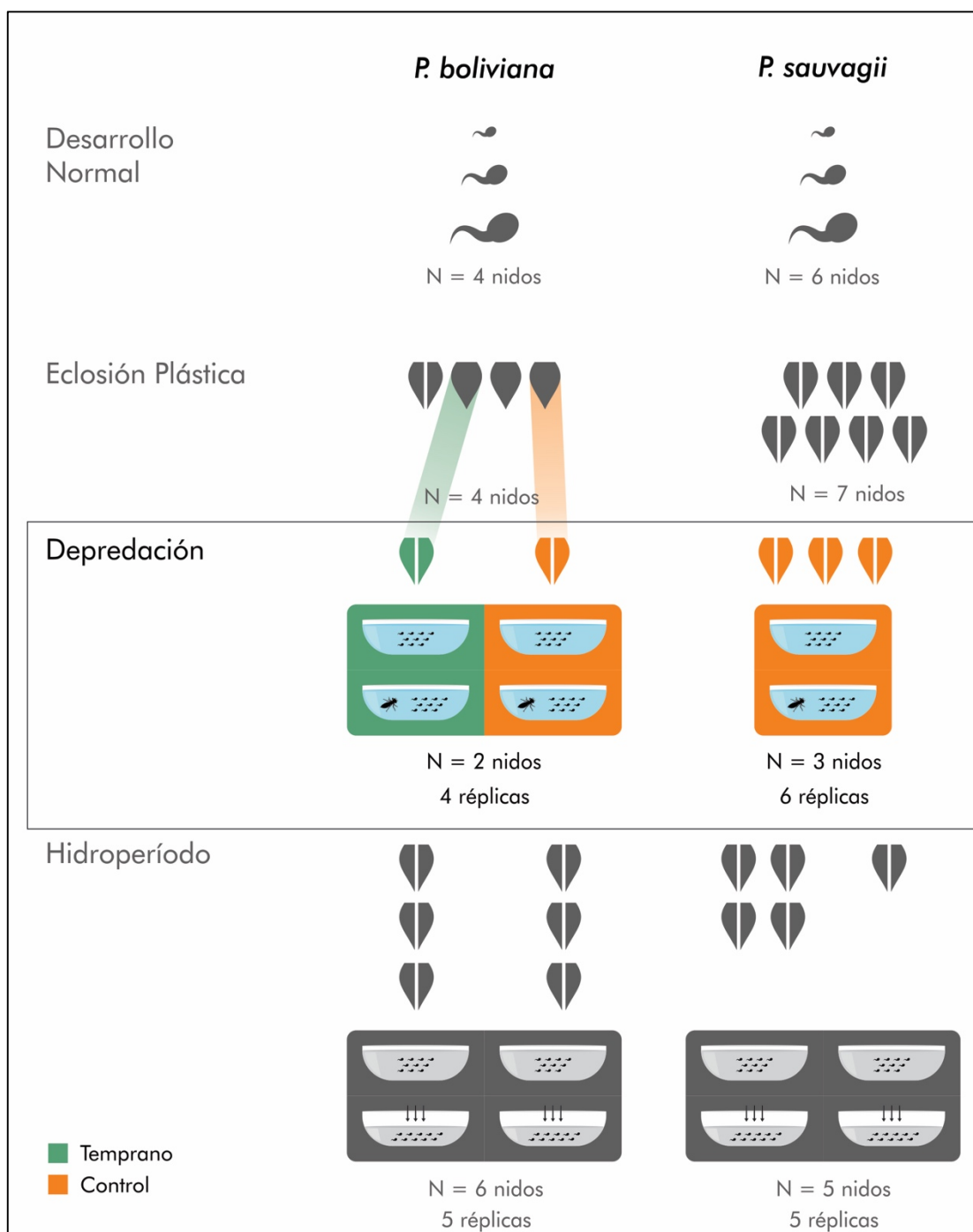


Figura 34. Resumen material y métodos empleados en el experimento de depredación, enfatizado en el esquema general.



Figura 35. Mesocosmos en donde se colocó las larvas de *P. boliviana* y *P. sauvagii* para realizar los experimentos de depredación.



Figura 36. Detalle de náyades de Odonata usadas en los experimentos de depredación.

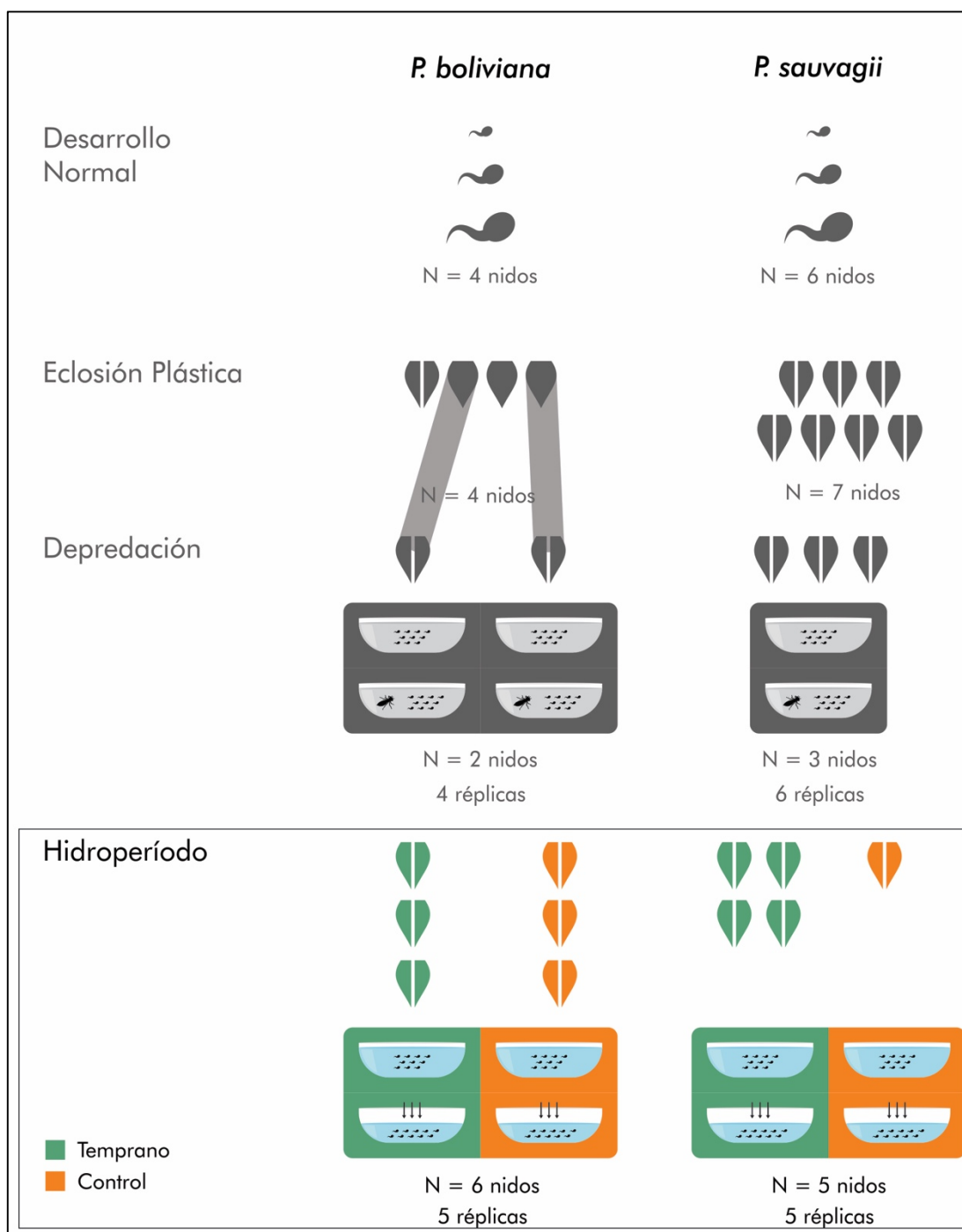


Figura 37. Resumen material y métodos empleados en el experimento de hidroperíodo, enfatizado en el esquema general.



Figura 38. Bandejas en donde se colocó las larvas de *P. boliviana* y *P. sauvagii* para realizar los experimentos de hidroperíodo.



Figura 39. Recipientes individuales en donde se colocaron los individuos de *P. boliviana* y *P. sauvagii* una vez que alcanzaron el estadio 42 (Gosner, 1960) durante los experimentos de depredación e hidroperíodo.

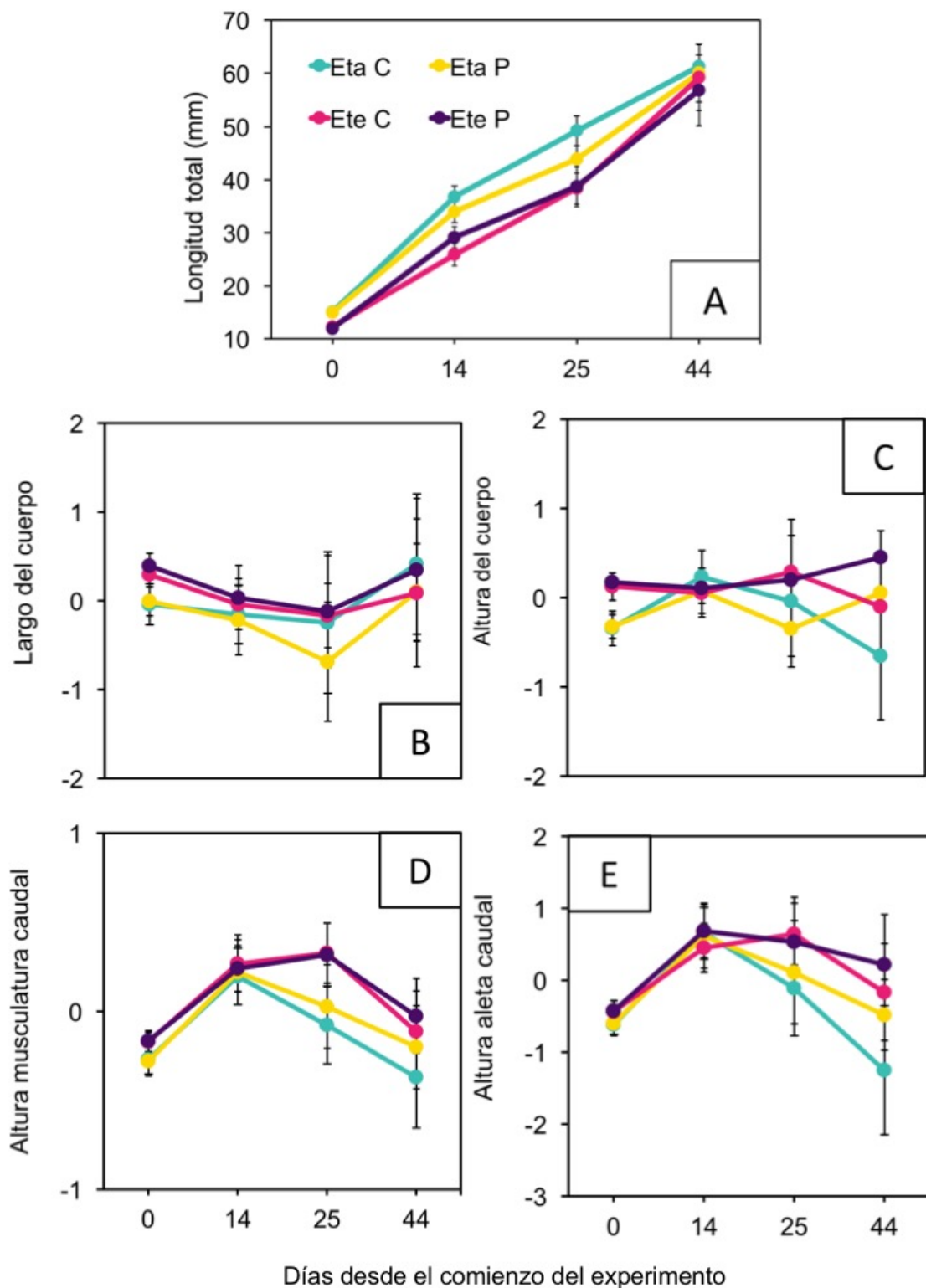


Figura 40. Medidas morfométricas de larvas (hasta el estadio 41) con dos edades de eclosión de *P. boliviana* con y sin señales de depredación tomadas a lo largo del experimento. Ete C: Eclosión temprana sin señales de depredación. Ete P: Eclosión temprana con señales de depredación. Los valores corresponden a la media \pm SD de las medidas reales para la longitud total (A) y para el resto se utilizó los residuos de una regresión entre la longitud total y cada variable (B, C, D, E).

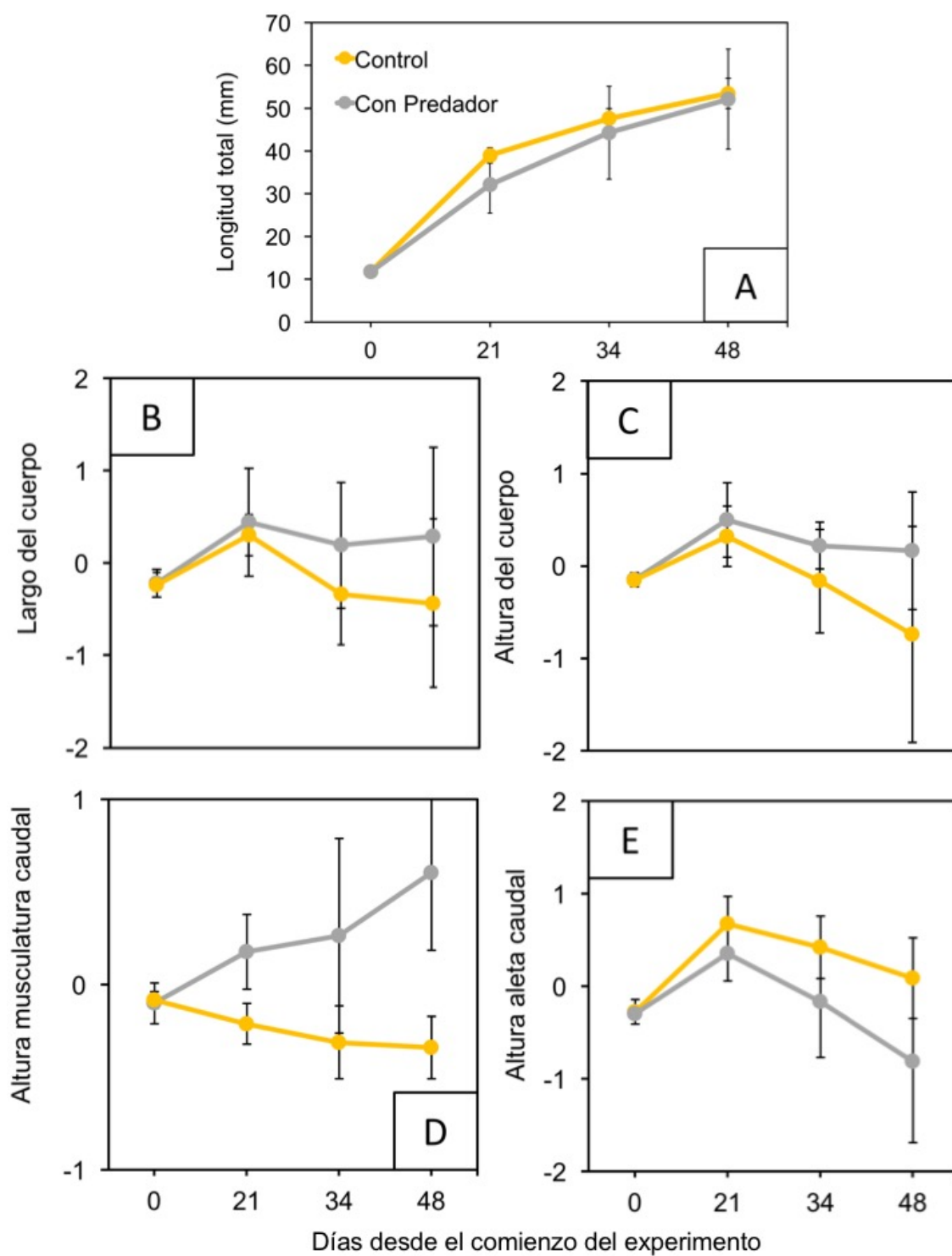


Figura 41. Medidas morfométricas de larvas (hasta el estadio 41) de *P. sauvagii* tomadas a lo largo del experimento con y sin señales de depredación. (A) Longitud total; (B) Largo del cuerpo; (C) Altura del cuerpo; (D) Altura de la musculatura caudal; (E) Altura de la aleta caudal. Los valores corresponden a la media \pm SD de las medidas reales para la longitud total (A) y para el resto se utilizó los residuos de una regresión entre la longitud total y cada variable (B, C, D, E).

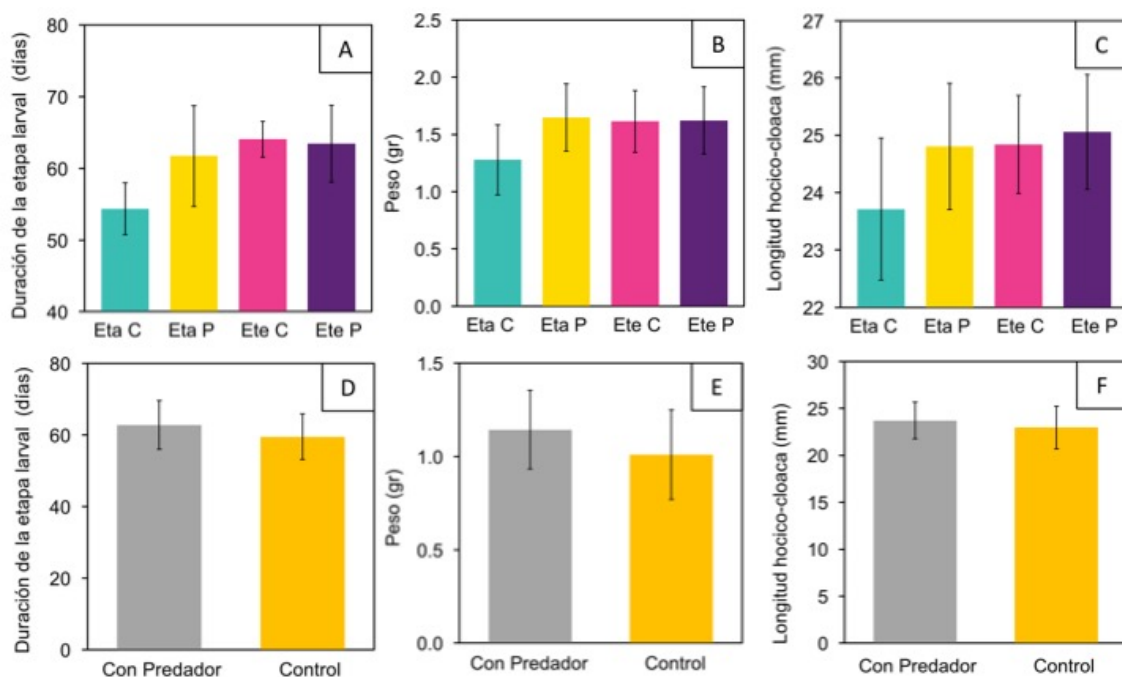


Figura 42. Duración de la etapa larval y tamaño al momento de la metamorfosis en individuos de *P. boliviana* (A, B, C) y *P. sauvagii* (D, E, F) a lo largo del experimento de depredación. (A y D) Días desde el comienzo del experimento que les toma a los individuos llegar al estadio 42. Peso (B y E) y longitud hocico-cloaca (C y F) de individuos en estadio del 42 al 45. Los valores corresponden a la media \pm SD por tratamiento.

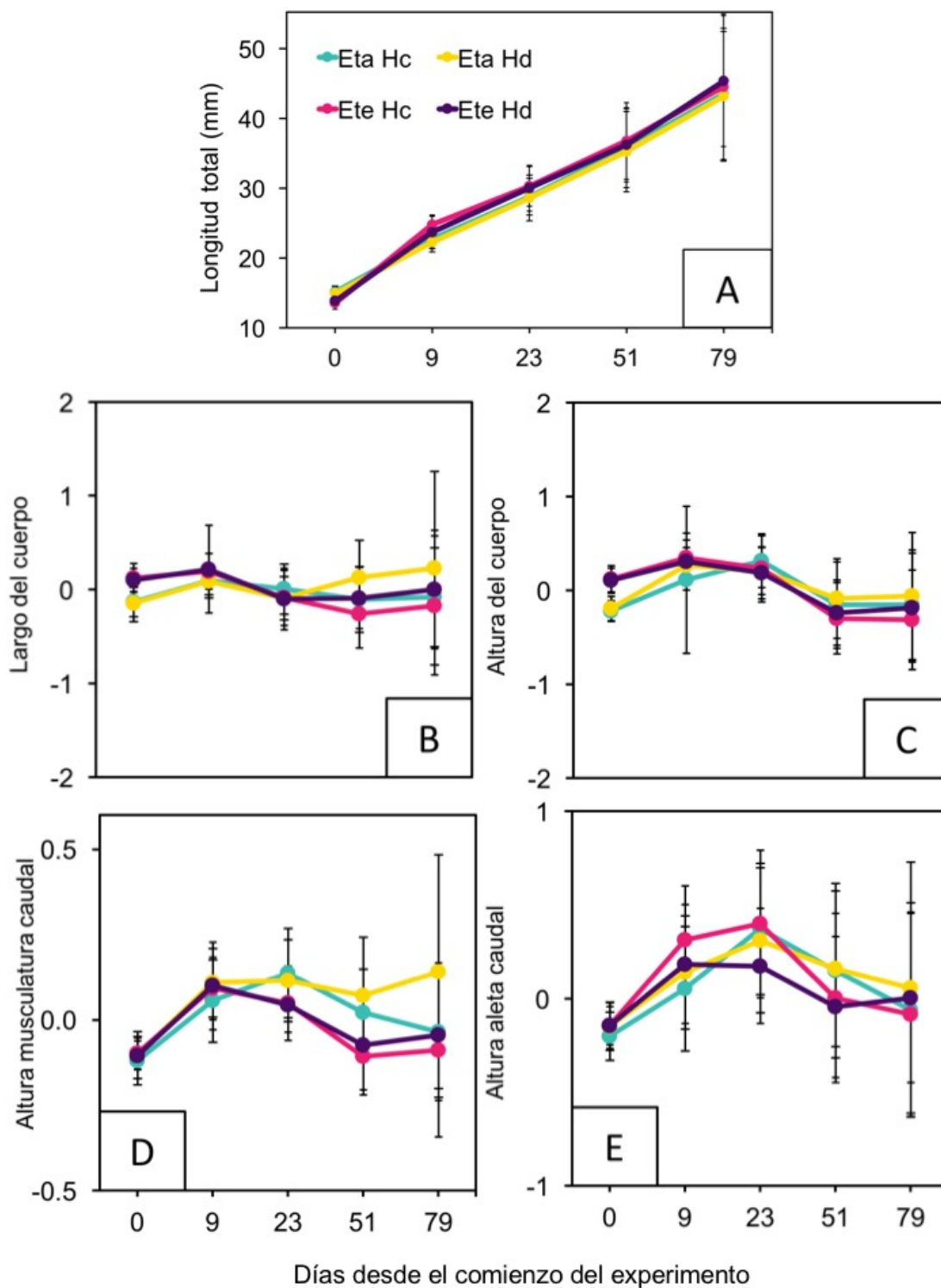


Figura 43. Medidas morfométricas de larvas (hasta el estadio 41) con dos edades de eclosión de *P. boliviana* tomadas a lo largo del experimento sometidas a dos hidroperíodos diferentes: constante y decreciente. Eta Hc: Eclosión normal con hidroperíodo constante. Eta Hd: Eclosión normal con hidroperíodo decreciente. Ete Hc: Eclosión temprana con hidroperíodo constante. Ete Hd: Eclosión temprana con hidroperíodo decreciente. Los valores corresponden a la media \pm SD de las medidas reales para la longitud total (A) y para el resto se utilizó los residuos de una regresión entre la longitud total y cada variable (B, C, D, E).

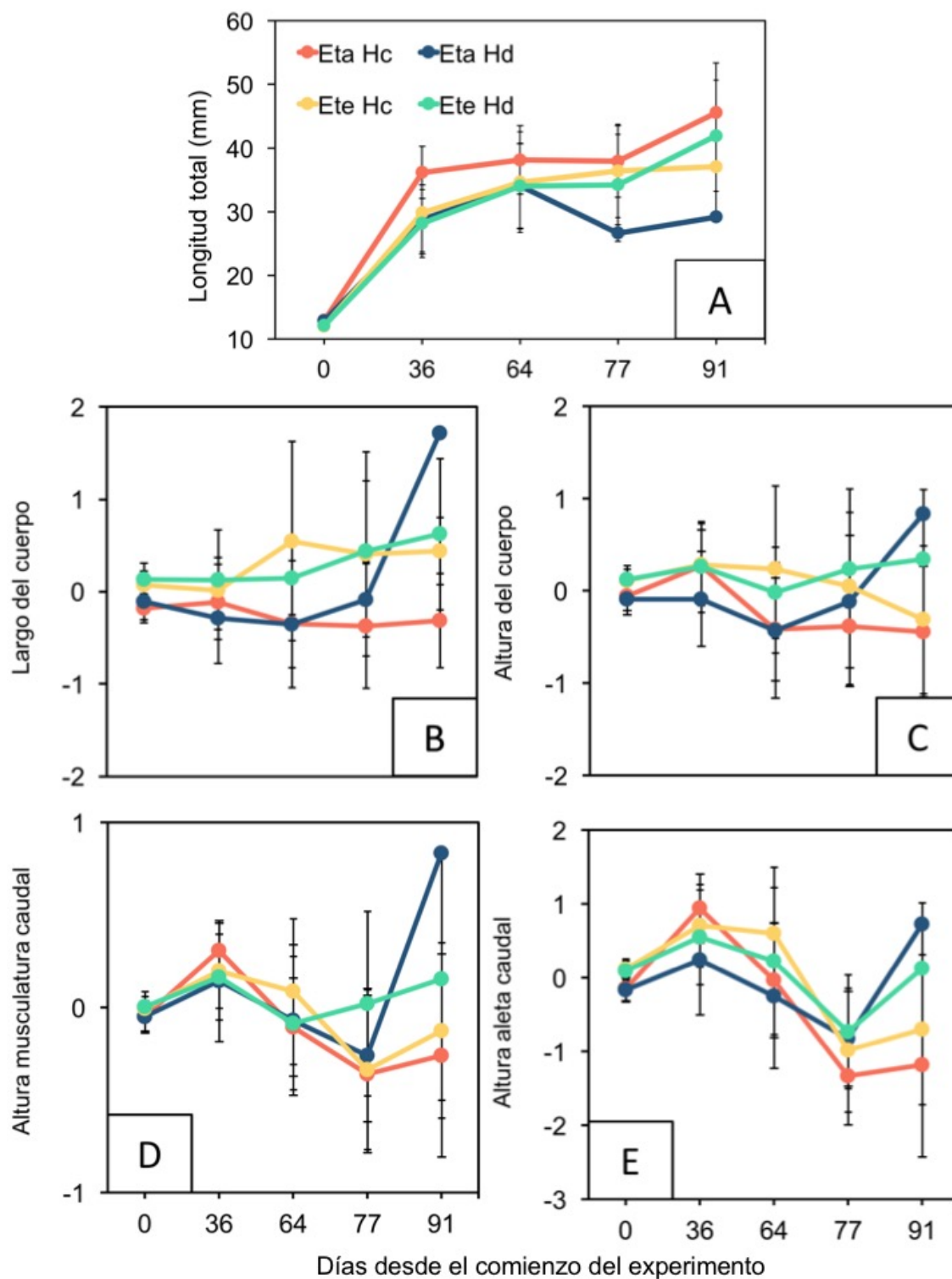


Figura 44. Medidas morfométricas de larvas (hasta el estadio 41) con dos edades de eclosión de *P. sauvagii* tomadas a lo largo del experimento sometidas a dos hidroperíodos diferentes: constante (control) y decreciente. (A) Longitud total; (B) Largo del cuerpo; (C) Altura del cuerpo; (D) Altura de la musculatura caudal; (E) Altura de la aleta caudal. Los valores corresponden a la media \pm SD de las medidas reales para la longitud total (A) y para el resto se utilizó los residuos de una regresión entre la longitud total y cada variable (B, C, D, E).

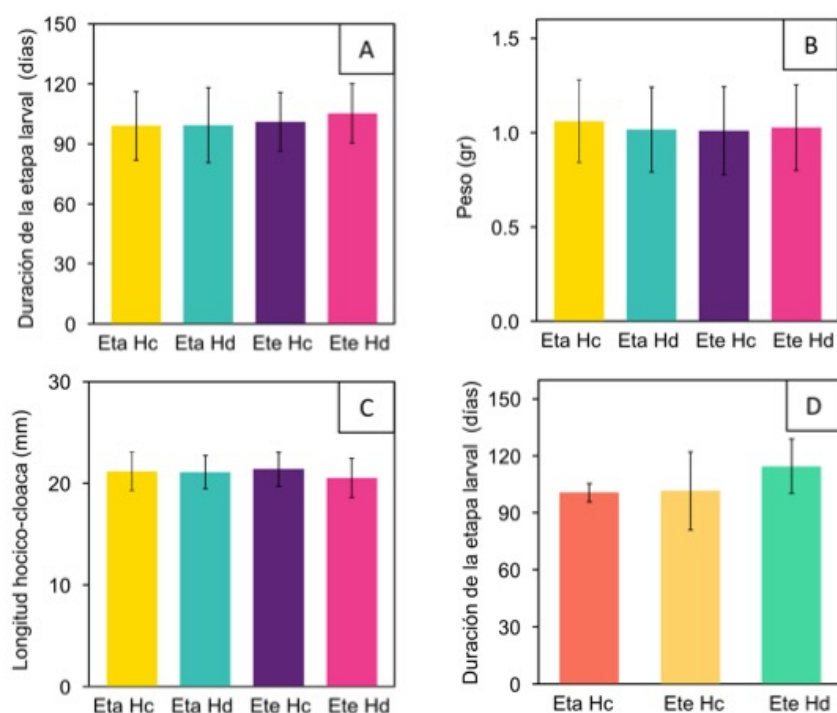


Figura 45. Duración de la etapa larval y tamaño al momento de la metamorfosis en individuos de *P. boliviana* (A, B, C) y *P. sauvagii* (D) sometidos a dos hidroperíodos diferentes: constante (control) y decreciente y con dos edades de eclosión. (A) Días desde el comienzo del experimento que les toma a los individuos llegar al estadio 42. Peso (B) y longitud hocico-cloaca (C) de individuos en estadio del 42 al 44. Los valores corresponden a la media \pm SD por tratamiento.

Tabla 8. Detalle de los tratamientos usados para el experimento de depredación de larvas de *P. boliviana*.

Tratamiento	Abreviatura	Edad de Eclosión	Señal de Depredación
Eclosión normal – Sin depredador	Eta C	9 días	Sin
Eclosión normal – Con depredador	Eta P	9 días	Con
Eclosión temprana – Sin depredador	Ete C	7 días	Sin
Eclosión temprana – Con depredador	Ete P	7 días	Con

Tabla 9. Detalle de los tratamientos usados para los experimentos de hidropériodo de larvas de *P. boliviana* y *P. sauvagii*.

Tratamiento	Abreviatura	Edad de Eclosión	Hidropériodo
Eclosión normal – Constante	Eta Hc	9/7 días	Constante
Eclosión normal – Decreciente	Eta Hd	9/7 días	Decreciente
Eclosión temprana – Constante	Ete Hc	7/5 días	Constante
Eclosión temprana – Decreciente	Ete Hd	7/5 días	Decreciente

Tabla 10. Mortalidad de larvas y número de individuos que alcanzaron la metamorfosis al final de los experimentos de depredación de *P. boliviana*. * El valor de % corresponde al porcentaje para cada tratamiento.

Tratamiento	Mortalidad		Metamorfos	
	N	%*	N	%*
Eta C	3	7,5	37	92,5
Eta P	18	45	22	55
Ete C	24	60	16	40
Ete P	22	55	18	45
Total	67	41,9%	93	58,1%

Tabla 11. Resultados de los modelo lineal mixto mostrando los efectos del tratamiento depredador (con y sin depredador) y edad de eclosión (normal o temprana) en la longitud total a lo largo del experimento de larvas de *P. boliviana*

Modelos	β	EE	gl	t	P
Día 0					
Intercept	15.04	0,11	144	132.64	<0.01
Edad de eclosión (temprana)	-2.79	0,16	12	-17.46	<0.001
Depredador (c/ depredador)	-0.101	0.16	12	-0.63	0.54
Edad de eclosión*Depredador	-0.22	0.22	12	-0.99	0.34
Día 14					
Intercept	36.78	0.45	142	81.39	<0.001
Edad de eclosión	-10.902	0.63	12	-16,95	<0.001
Predador	-2.76	0.63	12	-4,33	0,001
Edad de eclosión*Predador	6.02	0.90	12	6,64	<0.001
Día 25					
Intercept	49.23	0.97	139	51.09	<0.001
Edad de eclosión	-10.84	1.37	12	-7.93	<0.001
Predador	- 5.24	1.37	12	-3.82	<0.01
Edad de eclosión*Predador	5.53	1.93	12	2.85	0,01
Día 44					
Intercept	61.35	2.16	120	28.37	<0.01
Edad de eclosión	-1.72	3.16	11	-0.55	0.59
Predador	0.88	3.31	11	-0.26	079
Edad de eclosión*Predador	-1.97	4.57	11	-0.43	0.67

Tabla 12. Resultados del modelo lineal mixto mostrando los efectos del tratamiento depredador (con y sin depredador) y edad de eclosión (normal o temprano) en las diferentes variables referidas a la forma al comienzo del experimento (día 0) en larvas de *P. boliviana*.

Modelos	β	EE	gl	t	P
Largo del cuerpo					
Intercept	0.34	0.31	143	1.08	0.28
Edad de eclosión (Temprano)	0.05	0.08	12	0.62	0.55
Depredador (c/ depredador)	0.03	0.06	12	0.46	0.65
Largo Total	0.29	0.02	143	13.98	<0.01
Edad de eclosión*Depredador	0.04	0.08	12	0.47	0.44
Altura del cuerpo					
Intercept	0.47	0.30	143	1.55	0.12
Edad de eclosión	0.22	0.08	12	2.86	0.01
Depredador	0.01	0.05	12	0.15	0.88
Largo Total	0.14	0.02	143	7.21	<0.01
Edad de eclosión*Depredador	0.02	0.07	12	0.214	0.83
Altura musculatura caudal					
Intercept	0.22	0.13	143	1.64	0.10
Edad de eclosión	0.03	0.03	12	1.01	0.33
Depredador	-0.01	0.02	12	-0.71	0.49
Largo Total	0.08	0.01	143	8.89	<0.01
Edad de eclosión*Depredador	-0.01	0.03	12	-0.34	0.74
Altura aleta caudal					
Intercept	0.45	0.28	143	1.57	0.12
Edad de eclosión	-0.03	0.07	12	-0.53	0.61
Depredador	0.01	0.04	12	0.13	0.90
Largo Total	0.13	0.02	143	6.95	<0.01
Edad de eclosión*Depredador	-0.024	0.058	12	-0.419	0.682

Tabla 13. Resultados del modelo lineal general mixto mostrando los efectos del tratamiento depredador (con y sin depredador) y edad de eclosión (normal o temprano) en las diferentes variables referidas a la forma el día 14 del experimento en larvas de *P. boliviana*.

Modelos	β	EE	gl	t	P
Largo del cuerpo					
Intercept	-1.14	0.51	141	-2.25	0.03
Edad de eclosión (Temprano)	0.08	0.17	12	0.39	0.70
Depredador (s/ depredador)	-0.07	0.09	12	-0.80	0.44
Largo Total	0.38	0.01	141	28.012	<0.01
Edad de eclosión*Depredador	0.16	0.15	12	1.11	0.29
Altura del cuerpo					
Intercept	-1.23	0.38	141	-3.19	0.01
Edad de eclosión	0.11	0.13	12	0.83	0.42
Depredador	-0.09	0.06	12	-1.33	0.201
Largo Total	0.26	0.01	141	24.75	<0.01
Edad de eclosión*Depredador	0.05	0.10	12	-0.51	0.62
Altura musculatura caudal					
Intercept	0.80	0.24	141	3.57	<0.01
Edad de eclosión	-0.07	0.09	12	-0.84	0.42
Depredador	-0.01	0.06	12	-0.201	0.84
Largo Total	0.09	0.01	141	15.05	<0.01
Edad de eclosión*Depredador	0.03	0.09	12	0.32	0.75
Altura aleta caudal					
Intercept	-0.20	0.51	141	-0.41	0.68
Edad de eclosión	0.03	0.21	12	0.12	0.90
Depredador	0.02	0.14	12	0.16	0.87
Largo Total	0.23	0.01	141	15.43	<0.01
Edad de eclosión*Depredador	0.14	0.21	12	0.64	0.54

Tabla 14. Resultados del modelo lineal general mixto mostrando los efectos del tratamiento depredador (con y sin depredador) y edad de eclosión (normal o temprano) en las diferentes variables referidas a la forma el día 25 del experimento en larvas de *P. boliviana*.

Modelos	β	EE	gl	t	P
Largo del cuerpo					
Intercept	-0.15	0.69	138	-0.21	0.83
Edad de eclosión (Temprano)	-0.19	0.33	12	-0.60	0.55
Depredador (s/ depredador)	-0.58	0.30	12	-1.90	0.08
Largo Total	0.36	0.01	138	26.82	<0.01
Edad de eclosión*Depredador	0.62	0.42	12	1.47	0.17
Altura del cuerpo					
Intercept	-1.84	0.55	138	-3.37	<0.01
Edad de eclosión	0.61	0.33	12	1.82	0.09
Depredador	-0.15	0.32	12	-0.48	0.64
Largo Total	0.26	0.01	138	25.45	<0.01
Edad de eclosión*Depredador	0.06	0.45	12	0.12	0.90
Altura musculatura caudal					
Intercept	0.48	0.21	138	2.24	0.03
Edad de eclosión	0.30	0.11	12	2.72	0.02
Depredador	0.06	0.10	12	0.58	0.57
Largo Total	0.09	0.01	138	23.11	<0.01
Edad de eclosión*Depredador	-0.08	0.15	12	-0.45	0.66
Altura aleta caudal					
Intercept	-0.35	0.69	138	-0.51	0.61
Edad de eclosión	0.78	0.29	12	2.63	0.02
Depredador	0.25	0.26	12	0.93	0.37
Largo Total	0.21	0.01	138	15.35	<0.01
Edad de eclosión*Depredador	-0.36	0.37	12	-0.97	0.35

Tabla 15. Resultados del modelo lineal general mixto mostrando los efectos del tratamiento depredador (con y sin depredador) y edad de eclosión (normal o temprano) en las diferentes variables referidas a la forma el día 44 del experimento en larvas de *P. boliviana*.

Modelos	β	EE	gl	t	P
Largo del cuerpo					
Intercept	-2.74	0.84	119	-3.24	0.01
Edad de eclosión (Temprano)	-0.37	0.31	11	-1.19	0,26
Depredador (s/ depredador)	-0,29	0.32	11	-0,92	0,38
Largo Total	0.42	0.013	119	31.59	<0.01
Edad de eclosión*Depredador	0.75	0.45	11	1.66	0,12
Altura del cuerpo					
Intercept	-1.95	0.70	119	-2.79	0.01
Edad de eclosión	0.42	0.41	11	1.03	0.32
Depredador	0.66	0.43	11	1.52	0.16
Largo Total	0.24	0.01	119	23.45	<0.01
Edad de eclosión*Depredador	0.09	0.60	11	0.14	0.89
Altura musculatura caudal					
Intercept	0.18	0.27	119	0.69	0.49
Edad de eclosión	0.21	0.07	11	3.35	<0.01
Depredador	0.17	0.08	11	2.19	0.05
Largo Total	0.09	0.01	119	22.56	<0.01
Edad de eclosión*Depredador	-0.11	0.11	11	-1.00	0.34
Altura aleta caudal					
Intercept	-0.33	0.83	119	-0.39	0.69
Edad de eclosión	1.04	0.29	11	3.54	<0.01
Depredador	0.74	0.30	11	2.44	0.03
Largo Total	0.19	0.01	119	14.44	<0.01
Edad de eclosión*Depredador	-0.38	0.42	11	-0.91	0.38

Tabla 16. Resultados del modelo lineal general mixto mostrando los efectos del tratamiento depredador (con y sin depredador) en la longitud total a lo largo del experimento de larvas de *P. sauvagii*.

Modelos	β	EE	gl	t	P
Día 0					
Intercept	11.85	0.22	108	53.83	<0.01
Depredación	-0.06	0.31	10	-0.21	0.84
Día 21					
Intercept	3.66	0.04	100	85.97	<0.01
Depredación	-0.22	0.06	10	-3.58	0.01
Día 34					
Intercept	47.81	2.17	98	21.96	<0.01
Depredación	-3.22	3.08	10	-1.04	0.32
Día 48					
Intercept	53.77	3.71	85	14.49	<0.01
Depredación	-1.09	5.25	10	-0.21	0.84

Tabla 17. Resultados del modelo lineal general mixto mostrando los efectos del tratamiento depredador (con y sin depredador) en las diferentes variables referidas a la forma al comienzo del experimento (día 0) en larvas de *P. sauvagii*.

Modelos	β	EE	gl	t	P
Largo del cuerpo					
Intercept	1.03	0.223	107	4.49	<0.01
Depredación	0.01	0.08	10	0.05	0.95
Largo Total	0.21	0.02	107	10.99	<0.01
Altura del cuerpo					
Intercept	1.10	0.19	107	5.76	<0.01
Depredación	-0.01	0.06	10	-0.04	0.96
Largo Total	0.09	0.01	107	6.36	<0.01
Altura musculatura caudal					
Intercept	0.74	0.14	107	5.28	<0.01
Depredación	-0.02	0.06	10	-0.36	0.72
Largo Total	0.06	0.01	107	5.19	<0.01
Altura aleta caudal					
Intercept	0.32	0.28	107	1.13	0.26
Depredación	0.02	0.06	10	0.29	0.778
Largo Total	0.17	0.02	107	6.88	<0.01

Tabla 18. Resultados del modelo lineal general mixto mostrando los efectos del tratamiento depredador (con y sin depredador) en las diferentes variables referidas a la forma al comienzo del experimento (día 21) en larvas de *P. sauvagii*.

Modelos	β	EE	gl	t	P
Largo del cuerpo					
Intercept	-0.50	0.51	99	-0.98	0.33
Depredación	0.05	0.27	10	0.18	0.86
Largo Total	0.41	0.01	99	33.64	<0.01
Altura del cuerpo					
Intercept	-0.70	0.38	99	-1.82	0.07
Depredación	0.27	0.21	10	1.26	0.23
Largo Total	0.26	0.01	99	28.49	<0.01
Altura musculatura caudal					
Intercept	0.36	0.06	99	6.39	<0.01
Depredación	0.09	0.02	10	3.40	<0.01
Largo Total	0.03	0.01	99	20.13	<0.01
Altura aleta caudal					
Intercept	-0.16	0.38	99	-0.41	0.68
Depredación	0.39	0.18	10	2.12	0.06
Largo Total	0.23	0.01	99	24.9	<0.01

Tabla 19. Resultados del modelo lineal general mixto mostrando los efectos del tratamiento depredador (con y sin depredador) en las diferentes variables referidas a la forma al comienzo del experimento (día 34) en larvas de *P. sauvagii*.

Modelos	β	EE	gl	t	P
Largo del cuerpo					
Intercept	0.69	0.49	97	1.43	0.16
Depredación	0.37	0.37	10	1.02	0.33
Largo Total	0.37	0.01	97	43.47	<0.01
Altura del cuerpo					
Intercept	0.04	0.42	97	0.09	0.92
Depredación	0.33	0.26	10	1.28	0.23
Largo Total	0.23	0.01	97	29.78	<0.01
Altura musculatura caudal					
Intercept	-0.01	0.27	97	-0.03	0.029
Depredación	0.57	0.23	10	2.53	0.03
Largo Total	0.11	0.01	97	23.77	<0.01
Altura aleta caudal					
Intercept	0.83	0.42	97	1.97	0.01
Depredación	0.51	0.27	10	1.85	0.09
Largo Total	0.20	0.01	97	25.62	<0.01

Tabla 20. Resultados del modelo lineal general mixto mostrando los efectos del tratamiento depredador (con y sin depredador) en las diferentes variables referidas a la forma al comienzo del experimento (día 48) en larvas de *P. sauvagii*.

Modelos	β	EE	gl	t	P
Largo del cuerpo					
Intercept	1.26	0.84	90	1.50	0.14
Depredación	0.58	0.54	10	1.07	0.31
Largo Total	0.37	0.01	90	26.46	<0.01
Altura del cuerpo					
Intercept	0.59	0.77	90	0.76	0.45
Depredación	0.82	0.61	10	1.34	0.209
Largo Total	0.21	0.01	90	17.99	<0.01
Altura musculatura caudal					
Intercept	0.14	0.29	90	0.49	<0.01
Depredación	0.93	0.18	10	5.27	<0.01
Largo Total	0.10	0.01	90	20.98	<0.01
Altura aleta caudal					
Intercept	1.09	0.66	90	1.65	0.10
Depredación	0.81	0.45	10	1.79	0.10
Largo Total	0.18	0.01	90	17.27	<0.01

Tabla 21. Resultados del modelo lineal general mixto mostrando los efectos del tratamiento depredador (con y sin depredador) y la edad de eclosión (normal o temprano) en la duración de la etapa larval (días) y en el tamaño de metamorfosis (Peso y LHC) en *P. boliviana*.

Modelos	β	EE	t	P
Días				
Intercept	3.99	0.02	173.53	<0.01
Edad de eclosión (Temprano)	0.16	0.04	4.14	<0.01
Depredador (c/ depredador)	0.13	0.04	3.40	<0.01
Edad de eclosión*Depredador	-0.13	0.06	-2.28	0.02
Peso				
Intercept	1.30	0.10	13.04	<0.01
Edad de eclosión (Temprano)	0.33	0.16	2.09	0.06
Depredador (c/ depredador)	0.34	0.16	2.16	0.06
Edad de eclosión*Depredador	-0.31	0.22	-1.38	0.19
LHC				
Intercept	23.76	0.28	85.41	<0.01
Edad de eclosión	1.06	0.43	2.49	0.03
Depredador	1.04	0.46	2.28	0.04
Edad de eclosión*Depredador	-0.74	0.65	-1.14	0.28

Tabla 22. Resultados del MLGM (Distribución Poisson, enlace log) mostrando los efectos del tratamiento depredador (con y sin depredador) en la duración de la etapa larval (días) en *P. sauvagii*. Para el tamaño de metamorfosis (Peso y LHC) se usó un modelo lineal general mixto.

Modelos	β	EE	gl	t	z	P
Días						
Intercept	4.08	0.02			146.25	<0.01
Depredación	0.05	0.03			1.45	0.15
Peso						
Intercept	1.00	0.07	40	14.53		<0.01
Depredación	0.15	0.09	9	1.69		0.12
LHC						
Intercept	22.98	0.50	47	45.52		<0.01
Depredación	0.76	0.66	9	1.14		0.28

Tabla 23. Mortalidad de larvas y número de individuos que alcanzaron la metamorfosis al final de los experimentos de hidroperíodo de *P. boliviana* y *P. sauvagii*. * El valor de % corresponde al porcentaje para cada tratamiento.

Tratamiento	Mortalidad				Metamorfos			
	<i>P. boliviana</i>		<i>P. sauvagii</i>		<i>P. boliviana</i>		<i>P. sauvagii</i>	
	N	%*	N	%*	N	%*	N	%*
Eta Hc	32	64	48	96	18	36	2	4
Eta Hd	38	76	50	100	12	24	0	0
Ete Hc	29	58	48	96	21	42	2	4
Ete Hd	28	56	45	90	22	44	5	10
Total	127	63,5%	191	95,5%	73	36,5%	9	4,5%

Tabla 24. Resultados del modelo lineal general mixto mostrando los efectos del tratamiento hidroperíodo (decreciente) y edad de eclosión (temprana) sobre la longitud total a lo largo del experimento de larvas de *P. boliviana*.

Modelos	β	EE	gl	t	P
Día 0					
Intercept	15.124	0.201	176	75.161	<0.001
Eclosión (temprana)	-1.624	0.285	16	-5.698	<0.001
Hidroperíodo (decreciente)	-0.164	0.286	16	-0.576	0.572
Eclosión*Hidroperíodo	0.493	0.403	16	1.222	0.239
Día 9					
Intercept	22.833	0.272	172	83.672	<0.001
Eclosión	2.114	0.387	16	5.452	<0.001
Hidroperíodo	-0.655	0.386	16	-1.698	0.109
Eclosión*Hidroperíodo	-0.180	0.548	16	-0.329	0.746
Día 23					
Intercept	28.745	0.397	162	72.295	<0.001
Eclosión	2.081	0.571	16	3.643	0.002
Hidroperíodo	0.209	0.562	16	0.373	0.714
Eclosión*Hidroperíodo	-0.450	0.807	16	-0.557	0.585
Día 51					
Intercept	35.147	0.751	169	46.794	<0.001
Eclosión	1.615	1.051	16	1.536	0.144
Hidroperíodo	-0.247	1.057	16	-0.234	0.818
Eclosión*Hidroperíodo	0.211	1.498	16	0.141	0.889
Día 79					
Intercept	43.101	1.388	161	31.058	<0.001
Eclosión	1.951	1.973	16	0.988	0.337
Hidroperíodo	0.05	2.009	16	0.027	0.978
Eclosión*Hidroperíodo	0.232	2.8002	16	0.083	0.935

Tabla 25. Resultados del modelo lineal general mixto mostrando los efectos del tratamiento hidroperíodo (decreciente) y edad de eclosión (temprana) en las diferentes variables referidas a la forma al comienzo del experimento (día 0) en larvas de *P. boliviana*.

Modelos	β	EE	gl	t	P
Largo del cuerpo					
Intercept	0.523	0.183	179	2.847	0.005
Edad de eclosión (temprana)	0.112	0.044	16	2.541	0.022
Hidroperíodo (decreciente)	-0.034	0.040	16	-0.840	0.413
Largo Total	0.268	0.012	179	22.393	<0.001
Edad de eclosión* Hidroperíodo	0.039	0.056	16	0.685	0.503
Altura del cuerpo					
Intercept	0.451	0.153	179	2.941	0.004
Edad de eclosión	0.257	0.029	16	8.894	<0.001
Hidroperíodo	0.017	0.024	16	0.702	0.493
Largo Total	0.156	0.010	179	15.534	<0.001
Edad de eclosión* Hidroperíodo	-0.012	0.034	16	-0.360	0.723
Altura musculatura caudal					
Intercept	0.150	0.073	179	2.039	0.043
Edad de eclosión	-0.004	0.015	16	-0.275	0.787
Hidroperíodo	0.014	0.013	16	1.023	0.322
Largo Total	0.083	0.004	179	17.378	<0.001
Edad de eclosión* Hidroperíodo	-0.014	0.019	16	-0.783	0.445
Altura aleta caudal					
Intercept	0.458	0.153	178	2.987	0.003
Edad de eclosión	0.029	0.031	16	0.915	0.374
Hidroperíodo	0.047	0.027	16	1.738	0.101
Largo Total	0.167	0.010	178	16.593	<0.001
Edad de eclosión* Hidroperíodo	-0.049	0.039	16	-1.275	0.220

Tabla 26. Resultados del modelo lineal general mixto mostrando los efectos del tratamiento hidroperíodo (decreciente) y edad de eclosión (temprana) en las diferentes variables referidas a la forma en el día 9 en larvas de *P. boliviana*.

Modelos	β	EE	gl	t	P
Largo del cuerpo					
Intercept	-0.769	0.241	171	-3.180	0.002
Edad de eclosión (temprana)	0.083	0.049	16	1.686	0.111
Hidroperíodo (decreciente)	-0.001	0.045	16	-0.028	0.978
Largo Total	0.365	0.010	171	34.734	<0.001
Edad de eclosión* Hidroperíodo	-0.055	0.062	16	-0.875	0.394
Altura del cuerpo					
Intercept	-0.769	0.241	171	-3.180	0.002
Edad de eclosión	0.083	0.049	16	1.686	0.111
Hidroperíodo	-0.001	0.045	16	-0.028	0.978
Largo Total	0.365	0.010	171	34.734	<0.001
Edad de eclosión* Hidroperíodo	-0.054	0.063	16	-0.875	0.395
Altura musculatura caudal					
Intercept	-0.231	0.107	174	-2.157	0.032
Edad de eclosión	0.006	0.026	16	0.229	0.822
Hidroperíodo	0.058	0.024	16	2.429	0.027
Largo Total	0.114	0.005	174	24.409	<0.001
Edad de eclosión* Hidroperíodo	-0.059	0.033	16	-1.757	0.098
Altura aleta caudal					
Intercept	-1.739	0.297	176	-5.838	<0.001
Edad de eclosión	0.056	0.076	16	0.738	0.471
Hidroperíodo	0.133	0.072	16	1.851	0.082
Largo Total	0.282	0.013	176	21.870	<0.001
Edad de eclosión* Hidroperíodo	-0.172	0.102	16	-1.682	0.112

Tabla 27. Resultados del modelo lineal general mixto mostrando los efectos del tratamiento hidroperíodo (decreciente) y edad de eclosión (temprana) en las diferentes variables referidas a la forma en el día 23 en larvas de *P. boliviana*.

Modelos	β	EE	gl	t	P
Largo del cuerpo					
Intercept	-1.191	0.192	165	-6.211	<0.001
Edad de eclosión (temprana)	-0.108	0.093	16	-1.168	0.259
Hidroperíodo (decreciente)	-0.094	0.092	16	-1.016	0.324
Largo Total	0.375	0.006	165	59.67	<0.001
Edad de eclosión* Hidroperíodo	0.061	0.130	16	0.472	0.643
Altura del cuerpo					
Intercept	-1.060	0.192	167	-5.525	<0.001
Edad de eclosión	-0.154	0.071	16	-2.167	0.046
Hidroperíodo	-0.134	0.070	16	-1.906	0.075
Largo Total	0.251	0.006	167	39.032	<0.001
Edad de eclosión* Hidroperíodo	0.091	0.099	16	0.912	0.375
Altura musculatura caudal					
Intercept	-0.208	0.069	166	-3.000	0.003
Edad de eclosión	-0.103	0.022	16	-4.646	<0.001
Hidroperíodo	-0.007	0.0218	16	-0.339	0.738
Largo Total	0.122	0.002	166	47.944	<0.001
Edad de eclosión* Hidroperíodo	0.007	0.031	16	0.242	0.8114
Altura aleta caudal					
Intercept	-1.074	0.201	164	-5.349	<0.001
Edad de eclosión	-0.087	0.082	16	-1.052	0.308
Hidroperíodo	-0.024	0.081	16	-0.295	0.772
Largo Total	0.251	0.007	164	37.381	<0.001
Edad de eclosión* Hidroperíodo	-0.167	.116	16	-1.447	0.167

Tabla 28. Resultados del modelo lineal general mixto mostrando los efectos del tratamiento hidroperíodo (decreciente) y edad de eclosión (temprana) en las diferentes variables referidas a la forma en el día 51 en larvas de *P. boliviana*.

Modelos	β	EE	gl	t	P
Largo del cuerpo					
Intercept	-1.565	0.160	167	-9.774	<0.001
Edad de eclosión (temprana)	-0.192	0.065	16	-2.953	0.009
Hidroperíodo (decreciente)	0.217	0.065	16	3.348	0.004
Largo Total	0.378	0.004	167	88.506	<0.001
Edad de eclosión* Hidroperíodo	-0.019	0.09	16	-0.207	0.838
Altura del cuerpo					
Intercept	-1.587	0.181	167	-8.750	<0.001
Edad de eclosión	-0.182	0.114	16	-1.593	0.131
Hidroperíodo	0.056	0.114	16	0.489	0.631
Largo Total	0.244	0.004	167	53.872	<0.001
Edad de eclosión* Hidroperíodo	0.025	0.161	16	0.154	0.879
Altura musculatura caudal					
Intercept	0.104	0.065	171	1.589	0.114
Edad de eclosión	-0.135	0.032	16	-4.275	0.001
Hidroperíodo	0.032	0.032	16	1.028	0.319
Largo Total	0.098	0.002	171	57.303	<0.001
Edad de eclosión* Hidroperíodo	0.001	0.045	16	0.012	0.991
Altura aleta caudal					
Intercept	-0.972	0.187	173	-4.639	<0.001
Edad de eclosión	-0.183	0.125	16	-1.461	0.163
Hidroperíodo	0.027	0.125	16	0.219	0.829
Largo Total	0.227	0.005	173	48.966	<0.001
Edad de eclosión* Hidroperíodo	-0.052	0.178	16	-0.291	0.774

Tabla 29. Resultados del modelo lineal general mixto mostrando los efectos del tratamiento hidroperíodo (decreciente) y edad de eclosión (temprana) en las diferentes variables referidas a la forma en el día 79 en larvas de *P. boliviana*.

Modelos	β	EE	gl	t	P
Largo del cuerpo					
Intercept	-1.503	0.195	156	-7.693	<0.001
Edad de eclosión (temprana)	-0.115	0.107	16	-1.074	0.299
Hidroperíodo (decreciente)	0.107	0.109	16	0.982	0.340
Largo Total	0.374	0.004	156	90.071	<0.001
Edad de eclosión* Hidroperíodo	0.025	0.153	16	0.163	0.873
Altura del cuerpo					
Intercept	-1.756	0.18	158	-9.756	<0.001
Edad de eclosión	-0.178	0.137	16	-1.293	0.214
Hidroperíodo	-0.058	0.141	16	-0.411	0.687
Largo Total	0.241	0.003	158	68.878	<0.001
Edad de eclosión* Hidroperíodo	0.143	0.196	16	0.727	0.477
Altura musculatura caudal					
Intercept	0.121	0.067	153	1.792	0.075
Edad de eclosión	-0.05	0.039	16	-1.28	0.219
Hidroperíodo	0.091	0.041	16	2.236	0.039
Largo Total	0.097	0.001	153	68.541	<0.001
Edad de eclosión* Hidroperíodo	-0.068	0.057	16	-1.205	0.246
Altura aleta caudal					
Intercept	-0.116	0.186	155	-0.625	0.533
Edad de eclosión	-0.05	0.148	16	-0.337	0.740
Hidroperíodo	0.18	0.513	16	1.173	0.258
Largo Total	0.198	0.003	155	56.049	<0.001
Edad de eclosión* Hidroperíodo	-0.131	0.213	16	-0.612	0.549

Tabla 30. Resultados de modelo lineal general mixto mostrando los efectos del tratamiento hidroperíodo (decreciente) y edad de eclosión (temprana) en la longitud total a lo largo del experimento de larvas de *P. sauvagii*.

Modelos	β	EE	gl	t	P
Día 0					
Intercept	12.915	0.209	180	61.664	<0.001
Edad de eclosión (temprana)	-0.899	0.296	16	-3.038	0.008
Hidroperíodo (decreciente)	-0.069	0.296	16	-0.232	0.819
Edad de eclosión* Hidroperíodo	0.160	0.419	16	0.383	0.707
Día 36					
Intercept	36.159	1.482	151	24.402	<0.001
Edad de eclosión	-6.527	2.105	16	-3.099	0.007
Hidroperíodo	-7.947	2.115	16	-3.758	0.002
Edad de eclosión* Hidroperíodo	6.542	2.984	16	2.192	0.043
Día 64					
Intercept	38.124	1.137	110	33.514	<0.001
Edad de eclosión	-3.379	1.772	16	-1.906	0.074
Hidroperíodo	-4.243	1.797	16	-2.360	0.031
Edad de eclosión* Hidroperíodo	3.533	2.594	16	1.362	0.192
Día 77					
Intercept	37.889	1.520	69	24.927	<0.001
Edad de eclosión	-1.229	2.331	13	-0.527	0.607
Hidroperíodo	-11.225	4.361	13	-2.574	0.231
Edad de eclosión* Hidroperíodo	8.906	5.007	13	1.778	0.0987
Día 91					
Intercept	45.557	1.926	34	23.654	<0.001
Edad de eclosión	-8.509	3.045	12	-2.794	0.016
Hidroperíodo	-16.407	8.395	12	-1.954	0.074
Edad de eclosión* Hidroperíodo	21.281	8.919	12	2.386	0.034

Tabla 31. Resultados del modelo lineal general mixto mostrando los efectos del tratamiento hidroperíodo (decreciente) y edad de eclosión (temprana) en las diferentes variables referidas a la forma al comienzo del experimento (día 0) en larvas de *P. sauvagii*.

Modelos	β	EE	gl	t	P
Largo del cuerpo					
Intercept	0.966	0.193	176	4.984	<0.001
Edad de eclosión (temprana)	0.143	0.058	16	2.452	0.0261
Hidroperíodo (decreciente)	0.06	0.057	16	1.097	0.289
Largo Total	0.226	0.0146	176	15.429	<0.001
Edad de eclosión* Hidroperíodo	-0.001	0.081	16	-0.02	0.990
Altura del cuerpo					
Intercept	0.927	0.187	179	4.934	<0.001
Edad de eclosión	0.079	0.047	16	1.669	0.114
Hidroperíodo	-0.042	0.046	16	-0.911	0.376
Largo Total	0.104	0.014	179	7.287	<0.001
Edad de eclosión* Hidroperíodo	0.063	0.065	16	0.973	0.345
Altura musculatura caudal					
Intercept	0.372	0.095	179	3.886	<0.001
Edad de eclosión	-0.005	0.021	16	-0.235	0.8174
Hidroperíodo	-0.005	0.020	16	-0.247	0.808
Largo Total	0.063	0.007	179	8.698	<0.001
Edad de eclosión* Hidroperíodo	0.018	0.028	16	0.645	0.528
Altura aleta caudal					
Intercept	0.033	0.175	167	0.191	0.849
Edad de eclosión	0.246	0.036	16	7.335	<0.001
Hidroperíodo	-0.015	0.0316	16	-0.477	0.639
Largo Total	0.163	0.0134	167	12.110	<0.001
Edad de eclosión* Hidroperíodo	-0.002	0.044	16	-0.06	0.950

Tabla 32. Resultados del modelo lineal general mixto mostrando los efectos del tratamiento hidroperíodo (decreciente) y edad de eclosión (temprana) en las diferentes variables referidas a la forma en el día 36 en larvas de *P. sauvagii*.

Modelos	β	EE	gl	t	P
Largo del cuerpo					
Intercept	-0.115	0.238	145	-0.483	0.629
Edad de eclosión (temprana)	0.040	0.144	16	0.298	0.769
Hidroperíodo (decreciente)	-0.347	0.148	16	-2.354	0.032
Largo Total	0.337	0.006	145	56.092	<0.001
Edad de eclosión* Hidroperíodo	0.326	0.202	16	1.619	0.125
Altura del cuerpo					
Intercept	-0.786	0.269	150	-2.920	0.004
Edad de eclosión	0.143	0.173	16	0.827	0.420
Hidroperíodo	-0.214	0.177	16	-1.210	0.244
Largo Total	0.224	0.007	150	33.519	<0.001
Edad de eclosión* Hidroperíodo	0.218	0.242	16	0.901	0.381
Altura musculatura caudal					
Intercept	-0.058	0.138	150	-0.419	0.675
Edad de eclosión	-0.102	0.103	16	-0.990	0.336
Hidroperíodo	-0.172	0.104	16	-1.643	0.119
Largo Total	0.121	0.003	150	36.623	<0.001
Edad de eclosión* Hidroperíodo	0.147	0.144	16	1.020	0.322
Altura aleta caudal					
Intercept	-1.262	0.291	144	-4.328	<0.001
Edad de eclosión	0.095	0.206	16	0.462	0.649
Hidroperíodo	-0.348	0.209	16	-1.658	0.117
Largo Total	0.250	0.007	144	35.726	<0.001
Edad de eclosión* Hidroperíodo	0.243	0.290	16	0.838	0.414

Tabla 33. Resultados del modelo lineal general mixto mostrando los efectos del tratamiento hidroperíodo (decreciente) y edad de eclosión (temprana) en las diferentes variables referidas a la forma en el día 64 en larvas de *P. sauvagii*.

Modelos	β	EE	gl	t	P
Largo del cuerpo					
Intercept	-0.672	0.268	101	-2.501	0.014
Edad de eclosión (temprana)	0.532	0.169	16	3.143	0.006
Hidroperíodo (decreciente)	-0.034	0.171	16	-0.198	0.845
Largo Total	0.346	0.006	101	53.741	<0.001
Edad de eclosión* Hidroperíodo	-0.049	0.242	16	-0.204	0.841
Altura del cuerpo					
Intercept	-1.545	0.341	106	-4.529	<0.001
Edad de eclosión	0.557	0.298	16	1.866	0.08
Hidroperíodo	0.097	0.303	16	0.319	0.753
Largo Total	0.225	0.007	106	31.573	<0.001
Edad de eclosión* Hidroperíodo	-0.224	0.427	16	-0.571	0.575
Altura musculatura caudal					
Intercept	-0.594	0.173	91	-3.430	<0.001
Edad de eclosión	0.142	0.168	16	0.84	0.412
Hidroperíodo	0.03	0.170	16	0.189	0.852
Largo Total	0.124	0.003	91	37.340	<0.001
Edad de eclosión* Hidroperíodo	-0.150	0.240	16	-0.626	0.540
Altura aleta caudal					
Intercept	-2.917	0.442	103	-6.593	<0.001
Edad de eclosión	0.846	0.344	16	2.455	0.026
Hidroperíodo	0.104	0.351	16	0.295	0.771
Largo Total	0.266	0.009	103	27.137	<0.001
Edad de eclosión* Hidroperíodo	-0.365	0.497	16	-0.734	0.473

Tabla 34. Resultados del modelo lineal general mixto mostrando los efectos del tratamiento hidroperíodo (constante y decreciente) y edad de eclosión (normal o temprano) en las diferentes variables referidas a la forma en el día 77 en larvas de *P. sauvagii*.

Modelos	β	EE	gl	t	P
Largo del cuerpo					
Intercept	-1.436	0.412	60	-3.484	<0.001
Edad de eclosión (temprana)	0.655	0.307	13	2.133	0.052
Hidroperíodo (decreciente)	0.426	0.469	13	0.909	0.379
Largo Total	0.365	0.009	60	38.745	<0.001
Edad de eclosión* Hidroperíodo	-0.223	0.562	13	-0.397	0.698
Altura del cuerpo					
Intercept	-2.451	0.443	65	-5.522	<0.001
Edad de eclosión	0.618	0.689	13	1.585	0.137
Hidroperíodo	0.685	0.577	13	1.187	0.256
Largo Total	0.248	0.009	65	26.854	<0.001
Edad de eclosión* Hidroperíodo	-0.541	0.697	13	-0.776	0.452
Altura musculatura caudal					
Intercept	-1.109	0.291	68	-3.814	<0.001
Edad de eclosión	0.065	0.219	13	0.298	0.770
Hidroperíodo	0.205	0.348	13	0.589	0.565
Largo Total	0.131	0.006	68	19.914	<0.001
Edad de eclosión* Hidroperíodo	0.131	0.412	13	0.317	0.756
Altura aleta caudal					
Intercept	-1.847	0.452	67	-4.080	<0.001
Edad de eclosión	0.445	0.364	13	1.221	0.245
Hidroperíodo	0.493	0.558	13	0.883	0.393
Largo Total	0.202	0.009	67	20.36	<0.001
Edad de eclosión* Hidroperíodo	-0.292	0.667	13	-0.438	0.668

Tabla 35. Resultados del modelo lineal general mixto mostrando los efectos del tratamiento hidroperíodo (constante y decreciente) y edad de eclosión (normal o temprano) en las diferentes variables referidas a la forma en el día 91 en larvas de *P. sauvagii*.

Modelos	β	EE	gl	t	P
Largo del cuerpo					
Intercept	-1.176	0.461	32	-2.549	0.015
Edad de eclosión (temprana)	0.889	0.310	12	2.864	0.014
Hidroperíodo (decreciente)	2.214	0.638	12	3.468	0.005
Largo Total	0.357	0.008	32	40.435	<0.005
Edad de eclosión* Hidroperíodo	-2.040	0.714	12	-2.856	0.014
Altura del cuerpo					
Intercept	-2.654	0.538	32	-4.927	<0.001
Edad de eclosión	0.477	0.343	12	1.388	0.190
Hidroperíodo	1.996	0.716	12	2.789	0.016
Largo Total	0.244	0.010	32	23.291	<0.001
Edad de eclosión* Hidroperíodo	-1.450	0.797	12	-1.818	0.094
Altura musculatura caudal					
Intercept	-1.436	0.461	32	-3.111	0.004
Edad de eclosión	0.329	0.288	12	1.143	0.275
Hidroperíodo	1.409	0.607	12	2.321	0.038
Largo Total	0.138	0.009	32	15.278	<0.001
Edad de eclosión* Hidroperíodo	-1.222	0.675	12	-1.809	0.095
Altura aleta caudal					
Intercept	-3.410	0.846	33	-4.032	<0.001
Edad de eclosión	0.882	0.528	12	1.673	0.120
Hidroperíodo	2.705	1.129	12	2.396	0.034
Largo Total	0.236	0.017	33	14.210	<0.001
Edad de eclosión* Hidroperíodo	-2.034	1.254	12	-1.624	0.131

Tabla 36. Resultados del modelo lineal generalizado mixto (Distribución Poisson, enlace log) mostrando los efectos del tratamiento hidroperíodo (constante y decreciente) y la edad de eclosión (normal o temprano) en la duración de la etapa larval (días) en *P. boliviana*. Para el tamaño de metamorfosis (Peso y LHC) se usó un modelo lineal general mixto.

Modelos	β	EE	gl	t	z	P
Días						
Intercept	4.599	0.035			130.53	<0.001
Eclosión	-0.003	0.049			-0.06	0.952
Hidroperíodo	-0.02	0.054			-0.376	0.707
Eclosión*Hidroperíodo	0.078	0.073			1.076	0.282
Peso						
Intercept	1.068	0.006	50	18.463		<0.001
Eclosión	-0.032	0.082	16	-0.399		0.695
Hidroperíodo	-0.05	0.089	16	-0.583		0.568
Eclosión*Hidroperíodo	0.004	0.119	16	0.378		0.710
LHC						
Intercept	21.188	0.438	49	48.338		<0.001
Eclosión	0.209	0.603	16	0.347		0.732
Hidroperíodo	-0.086	0.681	16	-0.127		0.900
Eclosión*Hidroperíodo	-0.772	0.889	16	-0.868		0.398

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos individualmente en los Capítulos, su integración y su comparación con datos de la literatura nos permiten discutir diferentes aspectos del desarrollo premetamórfico en phyllomedusidos y otros grupos de anuros. A continuación, presentamos los resultados más conspicuos de este trabajo, en el marco de la información disponible. Las siguientes secciones abordan aspectos de la ontogenia normal, eclosión plástica, plasticidad en la etapa larval, y la interacción entre éstas, para finalmente debatir las consecuencias a largo plazo de que eventos que suceden temprano en la ontogenia pueden acarrear a etapas posteriores del desarrollo.

LA ONTOGENIA TEMPRANA EN *PHYLLOMEDUSA*

Nuestros resultados muestran que el desarrollo temprano en los phyllomedusidos comparte un conjunto de características, a nivel interespecífico e intergenérico (Budgett, 1899; Kenny, 1968; Warkentin, 1999; Vargas y Gutiérrez, 2005; Salica *et al.*, 2011). Varios de los rasgos distintivos han sido relacionados con el tipo de puesta terrestre, un período intracapsular largo y la eclosión plástica (Kenny, 1968; Warkentin, 1999). Los huevos en estas especies son relativamente grandes (Rodrigues *et al.*, 2007) y con mucho vitelo. Chipman *et al.* (1999) describieron un patrón de desarrollo en embriones ricos en vitelo en *Hyperolius puncticulatus* que difiere del típico de los anuros; estos autores definieron un clivaje pseudo-meroblástico que da como resultado una masa de vitelo grande que permanece esférica hasta la eclosión, y un embrión curvado alrededor de ésta, en lugar del típico embrión alargado de otros anuros. Esta diferencia es particularmente evidente en el estadio de esbozo de cola (estadio 17 de Gosner). A pesar de que en esta Tesis no abordamos estudios detallados de la gastrulación, la configuración resultante de los embriones es casi idéntica a la descrita en *Hyperolius*. Huevos grandes ricos en vitelo y embriones curvados alrededor del saco vitelino a menudo han sido relacionados con oviposición en ambientes lóticos (por ejemplo, especies de varios géneros de hílidos; Faivovich *et al.*, 2006), o fuera del agua y desarrollo endotrófico (por ejemplo, *Myobatrachus gouldii*, *Phyllorhina sphagnicola*, *Platymanthis vitianus* y varios Terrarana; Anstis, 2007; De Bavay, 1993; Narayan *et al.*, 2011; Nokhbatolfoghahai *et al.*, 2010; Townsend y Stewart, 1985).

Los patrones morfológicos y ontogenéticos de las estructuras transitorias son también generalmente muy similares entre especies. A continuación sintetizamos los hallazgos fundamentales, destacando las variaciones principales que involucran presencia y morfología de las glándulas adhesivas.

El gran desarrollo de las branquias externas es característico de phyllomedusidos

Las branquias externas muestran un desarrollo extraordinario en los phyllomedusidos conocidos (ver Figs. 3, 6, 11, 15). En su extensión máxima, las branquias de las especies bajo estudio alcanzan casi el 30% de la longitud total. Nokhbatolfoghahai y Downie (2008) estimaron que la superficie de la branquia representa aproximadamente el 26% del área superficial del cuerpo en *Phyllomedusa trinitatis*. Adicionalmente, aspectos ultraestructurales pueden contribuir a aumentar la eficiencia de las branquias durante el intercambio gaseoso. Una función respiratoria previa a la eclosión se atribuye a la ciliación superficial, muy densa en estas especies (Nokhbatolfoghahai *et al.*, 2005). En segundo lugar, en embriones arborícolas de *Trachycephalus venulosus* Nokhbatolfoghahai y Downie (2008) destacan la importancia del grosor de la barrera sangre-agua y la presencia de fibras musculares que otorgan movilidad a las branquias.

El patrón morfológico y ontogenético del disco oral es en general conservado en la familia

Exceptuando las profundas modificaciones en el disco oral umbeliforme en larvas neustónicas de *Phasmahyla* (e.g., Costa y Carvalho-e-Silva, 2008), el aparato bucal en los phyllomedusidos es muy similar, con LTRF 2/3 y margen papilar con claro dorsal (ver Figs. 4, 7, 12, 16). Las partes del disco en *Phyllomedusa*, *Pithecopus* y *Agalychnis* se forman secuencialmente (este estudio; Vargas y Gutiérrez, 2005; Warkentin, 1999), diferenciándose en algunos aspectos del esquema general descrito para larvas exotróficas (Altig y McDiarmid, 1999). En el labio inferior, la primera hilera de dientes que se desarrolla es la correspondiente a la P1, y la hilera P2 aparece posteriormente como un pliegue transversal prominente. El desarrollo de los dientes labiales continúa al de las hileras y los primeros en emerger son los de la hilera P1. Al igual que *Agalychnis spurrelli*, en las especies estudiadas, el disco oral completa su desarrollo después de la eclosión, alrededor del estadio 27.

La glándula de eclosión tiene características únicas en Phyllomedusidae

En la mayoría de las especies conocidas de anuros, las células de eclosión están típicamente distribuidas en un arreglo en forma de Y, desde la región frontal

cefálica y continuando en una línea dorsal hasta aproximadamente la mitad del cuerpo; las células además se disponen contiguamente, formando parches de diversos tamaños en toda el área de extensión de la glándula (Altig y McDiarmid, 1999; Nokhbatolfoghahai y Downie, 2007). En los phyllomedusidos en cambio, las células de eclosión se disponen individuales, esparcidas en la región rostral rodeando las narinas, y entre las narinas y el disco oral (Downie *et al.*, 2013; Cohen *et al.*, 2016, 2019; Vera Candioti *et al.*, 2017). Incluso, hemos reportado células de eclosión intercaladas entre grupos de células secretoras de las glándulas adhesivas en *Hylomantis aspera* (Vera Candioti *et al.*, 2017).

En un estudio reciente, Cohen *et al.* (2019) identifican dos tipos morfológicamente diferentes de células de eclosión en *Agalychnis callidryas*. El primer tipo, que denominan células de eclosión temprana (“early HGCs”) consiste de células pequeñas, con microvellosidades largas, distribuidas en la región dorsal y rostral del embrión. Estas células se diferencian temprano en la ontogenia (tres días luego de la oviposición) y comienzan su regresión uno o dos días después. El segundo tipo, las células de eclosión tardía (“late HGCs”), aparece durante el día 4 del desarrollo, exclusivamente en la región rostral. Se trata de células de gran tamaño, microvellosidades cortas, y dispuestas por debajo del nivel de las células epidérmicas. Estas células comienzan su regresión luego de la eclosión. Con base en la disposición y morfología, Cohen *et al.* (2019) interpretan al tipo 1 como homólogo a las células de eclosión presentes en todas las demás especies de anuros.

Las células de eclosión temprana están presentes en las tres especies de *Phyllomedusa* estudiadas (ver Figs. 5A–C, 8B, 14). En *P. tetraploidea* aparecen en el estadio 19-20, más adelante en el desarrollo (estadio 23) se disponen en pequeñas hendiduras entre las células epiteliales y se mantienen visibles hasta el estadio 24. En *P. boliviana*, se pudo visibilizar estas glándulas entre los estadios 24 y 25, mientras que en *P. sauvagii* las células están presentes al menos desde el estadio 22 al 25. Por su morfología, interpretamos estas células como correspondientes al tipo temprano de Cohen *et al.* (2019). En ninguna especie de *Phyllomedusa* encontramos rastros de una morfología similar a la de las células tardías, y esto coincide con las observaciones en *P. trinitatis* donde Downie *et al.* (2013) describen también un único tipo. Por el contrario, las imágenes SEM sugieren la presencia de células de gran tamaño en la región rostral de *Pi. azureus*, dato que debe ser confirmado con una exploración más detallada.

Las glándulas adhesivas varían estructural y ontogenéticamente entre los phyllomedusidos

A diferencia de otras estructuras transitorias, las glándulas adhesivas muestran importantes variaciones entre los phyllomedusidos conocidos. Estas glándulas están ausentes en *P. boliviana* (ver Fig. 4), *P. trinitatis* y *Phasmahyla cochranæ* (Kenny, 1968; Nokhbatolfoghahai y Downie, 2005). En las demás especies se han descripto diferentes patrones morfológicos. *Phyllomedusa sauvagii* (ver Fig. 7B) y *Pithecopus rohdei* tienen glándulas cónicas y pequeñas (Lutz y Lutz, 1939; Salica *et al.*, 2011), mientras que *Pithecopus azureus* (Fig. 16) y *Agalychnis callidryas* muestran glándulas grandes, oblongas, dispuestas en un arreglo tipo herradura en torno al disco oral (Pyburn, 1963; Warkentin, 1999; Salica *et al.*, 2011). Adicionalmente, Vera Candioti *et al.* (2017) reportan glándulas funcionales presentes en *P. iheringii*, *P. tetraploidea* (e.g., Fig. 12F) y en *Hylomantis aspera*. El patrón de *P. iheringii* difiere del de *P. sauvagii* y *P. tetraploidea* en el arreglo de la región secretora, que en esta especie se presenta como pequeños parches de células con microvellosidades emergiendo entre las células epidérmicas. De manera similar, las glándulas de *H. aspera* difieren de las de *A. callidryas* en que son poco prominentes y muestran una región secretora discontinua.

El patrón morfogenético de las glándulas de *P. sauvagii*, *P. iheringii*, y *P. tetraploidea* corresponde al Tipo C definido por Nokhbatolfoghahai y Downie (2005), caracterizado por un surco inicial que se divide tempranamente (en estas especies antes de la apertura del estomodeo) en dos glándulas redondeadas posterolaterales al estomodeo. En *Pi. azureus*, *Agalychnis* e *Hylomantis* interpretamos las glándulas también como un Tipo C, con la diferencia de que en lugar de dos glándulas pequeñas y circulares, dos estructuras grandes y oblongas se separan temprano del campo inicial. El patrón tipo C es característico de hílidos como *Dendropsophus*, *Pseudis* y *Scinax* (Nokhbatolfoghahai y Downie, 2005; F. Vera Candioti datos no publicados), y ocurre en varios otros clados de anuros (e.g., leiuperinos, bufónidos, microhílidos, odontofrínidos; Nokhbatolfoghahai y Downie, 2005; Vera Candioti *et al.*, 2016; Vera Candioti y Grosso, datos no publicados). Al margen de las diferencias en morfología gruesa, los tipos celulares descriptos en las glándulas adhesivas de otros anuros están presentes en los phyllomedusidos. Las células de borde aparecen intercaladas y bordeando las glándulas, y persisten hasta aproximadamente el estadio 23 en que se desarrollan los neuromastos de las líneas laterales. Una ciliación poco densa se ha reportado en *Dendropsophus minutus*, *D. microcephalus*, *D. minusculus*, *Engystomops pustulosus* y *Xenopus laevis* (todos embriones con glándulas Tipo C exceptuando el último; Nokhbatolfoghahai y Downie, 2005; Nokhbatolfoghahai *et al.*, 2005).

Pithecopus azureus además presenta un cuarto tipo celular, agrupado en la región posterior a las glándulas y permanece como interrogante si estas células están implicadas en el mecanismo de adhesión o en otras funciones biológicas. Entre las especies que carecen de glándulas, los embriones de *P. trinitatis* muestran dos regiones prominentes posteriores al disco oral, sin signos de diferenciación tisular (Nokhbatolfoghahai y Downie, 2005). Estos abultamientos no son evidentes en *P. boliviana* de nuestro estudio.

La ontogenia de las glándulas es similar en las especies que estudiamos. Aparecen alrededor del estadio 19 y alcanzan su máximo desarrollo en el 22, ubicándose en las comisuras (las glándulas redondeadas) u ocupando un área extensa antero y posterolateral al disco (el arreglo en herradura). La regresión comienza en el estadio 23 aproximadamente y se completa luego de la emergencia de los miembros posteriores en todas las especies salvo *Pi. azureus*, que aún muestra células secretoras con miembros posteriores tan largos como anchos. El patrón de regresión es también similar entre las especies: la estructura primero pierde prominencia, y la diferenciación celular desaparece. Esto ocurre de forma irregular, resultando en una región secretora discontinua. El patrón de las glándulas de *P. iheringii* podría entonces ser interpretado un cambio heterocrónico de regresión temprana de las glándulas. En *Pi. azureus*, la regresión ocurre en una dirección postero-anterior, tal que la última región en perder diferenciación tisular es la anterior al disco oral; en las demás especies, la ubicación de las glándulas cambia de posterolateral a anterolateral a medida que la regresión progresa. Este patrón es similar a lo que ocurre en embriones de *Pseudis minuta* (Hylidae, Pseudinae), pero difiere del reportado para otros embriones con glándulas Tipo C (e.g., Nokhbatolfoghahai y Downie, 2005; Vera Candioti *et al.*, 2017). Por el contrario, en los embriones de *H. aspera* la regresión ocurre sincrónicamente en toda la glándula.

La familia Pelodryadidae ha sido propuesta como taxón hermano de Phyllomedusidae (Duellman *et al.*, 2016), divergiendo en el Eoceno e invadiendo Australia por vía Antártida. Varias especies de esta familia ponen sus huevos en arroyos (especies en los grupos de *Litoria angiana*, *L. arfakiana*, *L. becki*, *L. dorsivena*, *L. eucnemis*, *L. leucova*, *L. nannotis* y *L. napaea*, y también *L. aurifera*, *L. meiriana*, *rivicola*, *L. spartacus*, y especies anteriormente incluidas en el género *Nyctimystes*, ahora no asignadas a ningún grupo de especies en *Litoria*; Anstis *et al.*, 2010; Davies, 1989; Davies y Richards, 1990; Günther y Richards, 2005; Richards y Oliver, 2006; Tyler y Davies, 1978; 1979), y algunos lo hacen fuera del agua (los grupos *Litoria iris* y *L. prora*, *L. longirostris*, y posiblemente *L. umarensis*, Anderson *et al.*, 2010; Günther, 2006; McDonald y Storch, 1993; Menzies, 1993). En ambos casos, los huevos son

generalmente grandes y ricos en vitelo, a excepción de *L. aurifera* y *L. meiriana*, cuyos huevos son más pequeños (Anstis *et al.*, 2010; Tyler y Davies, 1978). Además, las etapas ontogenéticas tempranas de estas especies aparentemente difieren de los de las especies de charcos. En el estadio de esbozo de cola, los embriones de *L. eucnemis* se curvan alrededor del vitelo (Davies, 1989), en un notable parecido con los embriones de phyllomedusidos. La eclosión suele ser tardía en estos dos ambientes. Por ejemplo, los huevos de *L. iris*, que son colocados en hojas que cuelgan sobre el agua o alrededor de tallos de helecho, pueden eclosionar hasta después de 14 días (Tyler, 1963). Menzies (1993) describe un embrión sin eclosionar en estadio 22 y rico en vitelo en *L. havina*. Más estudios sobre los modos reproductivos, características morfológicas de los embriones, y observaciones de historia natural de la eclosión y biología embrionaria son fundamentales para la comprensión de la diversidad morfológica y ecológica en estos clados relacionados.

ECLOSIÓN Y ECLOSIÓN PLÁSTICA

Los datos recabados en esta tesis permiten establecer una comparación de la eclosión en embriones de *Phyllomedusa boliviana* y *P. sauvagii* respecto de lo conocido en otros phyllomedusidos. En los párrafos siguientes resumimos aspectos fundamentales, considerando semejanzas y diferencias en la eclosión espontánea, la facultad de eclosión plástica, incluyendo estímulos que la provocan y las consecuencias morfológicas a corto plazo, y el mecanismo de eclosión en sí.

La eclosión normal es similar en la mayoría de las especies de phyllomedusidos

En general, el desarrollo previo a la eclosión estudiado en phyllomedusidos dura entre 6 a 9 días, cuando los embriones salen espontáneamente de sus cápsulas de huevo y caen al agua (Fig. 9; Budgett, 1899; Gomez-Mestre *et al.*, 2008; Kenny, 1968; Pyburn, 1980; Vargas y Gutiérrez, 2005). Al igual que los taxones estudiados aquí, la mayoría de las especies eclosionan en estadios 23–24, con branquias externas aún bien desarrolladas (Kenny, 1968; Lescure *et al.*, 1995; Pyburn, 1980; Vargas y Gutiérrez, 2005; Warkentin, 1999). En *Agalychnis lemur*, *Phasmahyla cruzi* y *Phasmahyla guttata* la eclosión ocurre en el estadio 25, es decir, con el espiráculo ya formado (Costa y Carvalho e Silva, 2008; Costa *et al.*, 2010; Jungfer y Weygoldt, 1994). En otras ranas arborícolas la eclosión suele ser igualmente tardía y Delia *et al.* (2013) sugieren que en centrolénidos esto puede estar relacionado con niveles altos de cuidado parental.

Los estímulos que provocan eclosión temprana difieren interespecíficamente

Hasta la fecha, en todas las especies de Phyllomedusidae estudiadas se ha encontrado plasticidad en el momento en el que se produce la eclosión (Gomez-Mestre *et al.*, 2008; Downie *et al.*, 2013). Sin embargo, los estímulos capaces de inducir eclosión precoz difieren en los grupos estudiados.

La respuesta por inundación es fuerte y altamente conservada en todos los phyllomedusidos testeados hasta la actualidad (Warkentin 2011b), incluyendo *Phyllomedusa boliviana* y *P. sauvagii* en este estudio (Tablas 4 y 5). La eclosión temprana por inundación se produce por hipoxia, en respuesta a los bajos niveles de oxígeno presente en el agua comparado con el ambiente terrestre (Warkentin, 2002). Este tipo de eclosión está presente en especies basales de Phyllomedusidae, por lo que fue propuesto como un carácter ancestral dentro de la familia (Gomez-Mestre *et al.*, 2008). Concluir si esta capacidad es una sinapomorfía para phyllomedusidos o para un clado más inclusivo, dependerá de que la plasticidad en la eclosión se produzca en la familia hermana Pelodryadidae (Faivovich *et al.*, 2005; Wiens *et al.*, 2010; Duellman *et al.*, 2016), específicamente en especies del género *Litoria* que depositan huevos fuera del agua.

Los embriones de las dos especies bajo estudio no alteraron el tiempo de eclosión en los experimentos preliminares de precipitación que se realizaron. Estos resultados coinciden con lo reportado para *Phyllomedusa trinitatis* (Downie *et al.*, 2013), en donde tampoco se encontró evidencia de que los nidos puedan absorber agua proveniente de precipitaciones simuladas. En nuestros experimentos pudimos verificar como la estructura compacta del nido imposibilita la entrada de agua hacia el interior. Sin embargo, es probable que los embriones no necesiten estar en contacto directo con el agua de lluvia, sino que sean capaces de percibir y responder a vibraciones provenientes de la lluvia. De hecho, los embriones de *A. callidryas* son capaces de diferenciar las vibraciones producidas por el ataque de serpientes de las vibraciones producidas por la lluvia (Warkentin, 2005; Warkentin *et al.*, 2007). Una respuesta discrecional a las precipitaciones, comprensible para evitar falsas alarmas en ambientes con precipitaciones muy frecuentes (Warkentin *et al.*, 2017), es intrigante en ambientes más secos, donde se esperaría un menor umbral de respuesta por ser el estímulo escaso. La falta de respuesta al diseño con goteo podría sugerir una respuesta más exigente, sintonizada a niveles de precipitación muy intensos que garanticen la formación y persistencia de charcos para desarrollo de las larvas. Claramente el rol de las precipitaciones en la eclosión plástica en *Phyllomedusa* debe ser más profundamente explorado, comenzando por un ajuste del método empleado para simular la precipitación que considere sus patrones de cantidad y periodicidad.

En tercer lugar, los embriones de *Agalychnis* son capaces de eclosionar tempranamente ante el ataque de diversos depredadores (Warkentin, 1995; Warkentin, 2000a). En este estudio, a pesar de que existió un gran esfuerzo de muestreo no registramos signos evidentes de depredación en los nidos de ninguna especie. La estructura de los nidos puede incidir en los efectos de la depredación al menos en dos aspectos. Por un lado, puede intervenir en la protección ante el estímulo, de tal manera que nidos abiertos como los de los phyllomedusidos más basales permiten la exposición de los huevos y embriones y los nidos cerrados ofrecen más protección (Faivovich *et al.*, 2010). En segundo lugar, la estructura del nido determina la inmediatez de la eventual respuesta, tal que en nidos abiertos los embriones inducidos caen inmediatamente al agua, mientras que en nidos cerrados pueden eclosionar pero permanecen en el nido hasta que el tapón inferior se disuelve (Downie *et al.*, 2013). Al igual que en nuestro estudio, Downie *et al.* (2013) no registraron nidos depredados en *Phyllomedusa trinitatis*, con un esfuerzo de muestreo de varios años (5 temporadas reproductivas). Dado que existen registros de depredación por insectos y mamíferos en nidos de *Phyllomedusa* (*P. bicolor*, *P. tarsius*, *P. tomopterna*; Neckel-Oliveira y Wachlevski, 2004), Downie *et al.* (2013) sugieren que las diferencias pueden deberse a una baja presión de depredación en los ambientes alterados donde efectuaron sus estudios. En nuestro caso, no existen reportes de eventos de depredación de nidos de las especies incluidas, en los ambientes muestreados, por lo que en principio se requieren estudios más detallados de la identidad de potenciales depredadores y estudios de sus poblaciones. Los tipos de depredadores reportados para nidos de *Phyllomedusa* son insectos y mamíferos (Neckel-Oliveira y Wachlevski, 2004; Filadelfo *et al.*, 2013; D. Baldo, com. pers.) y éstos pueden representar diferentes tipos de amenazas y eventuales respuestas. La estructura de los nidos puede además interactuar con el tipo de depredador, generando respuestas particulares. En nidos cerrados, donde los embriones no pueden escapar inmediatamente, es poco probable una respuesta de eclosión precoz ante ataques súbitos y que comprometen al nido completo como podrían ser los de los mamíferos. Por el contrario, el ataque paulatino y más sectorizado de depredadores insectos podría inducir alguna respuesta.

Por último, si bien no se registró respuesta en el nido infectado por patógenos que se colectó durante este estudio, no se descarta que otras especies de hongos o infecciones más severas puedan afectar el tiempo de eclosión. En especial, teniendo en cuenta que los hongos producen la misma respuesta de eclosión lenta y paulatina que los insectos (Warkentin *et al.*, 2001b).

La extensión del período plástico difiere interespecíficamente

Los embriones del grupo de especies de *Agalychnis callidryas*, *A. dacnicolor* y *Cruziohyla calcarifer* pueden eclosionar tempranamente luego de un lapso tan corto como el 36% del que requiere la eclosión espontánea, en respuesta a disturbios mecánicos y a inundación (Warkentin, 2007; Gomez-Mestre *et al.*, 2008). En *A. callidryas* y *P. trinitatis* esto corresponde aproximadamente al estadio 21 (Warkentin *et al.*, 2017; Kenny, 1968; Downie *et al.*, 2013). En *Phyllomedusa boliviana* y *P. sauvagii* la eclosión temprana se da a partir de los estadios 23–24, en momentos que representan un 60–75% del lapso normal (Tablas 4 y 5). Para que un embrión sea capaz de eclosionar temprano en respuesta a estímulos es necesario que se den dos procesos independientes que involucren diferentes estructuras morfológicas. Por un lado el embrión debe ser capaz de percibir el estímulo, y por otra parte debe tener la capacidad de salir del huevo (Warkentin *et al.*, 2017). Las diferencias en el período plástico, es decir, la adquisición de la competencia para eclosionar tempranamente, están entonces sin duda en principio relacionadas con aspectos morfológicos implicados en estos dos procesos, tema que se resume a continuación.

El mecanismo de eclosión y las estructuras involucradas difieren interespecíficamente

Varias estructuras de la región oral de los embriones pueden estar involucradas en la detección de los estímulos y en el mecanismo de eclosión, incluyendo los neuromastos de las líneas laterales, la glándula de eclosión y las glándulas adhesivas.

Los neuromastos de las líneas laterales son candidatos lógicos para postular intervención en detección de estímulos mecánicos (Warkentin *et al.*, 2017). En *Agalychnis*, neuromastos ya desarrollados se pueden observar mucho antes del inicio del período plástico, por lo que Cohen *et al.* (2019) postulan que otras características anatómicas o fisiológicas (e.g., innervación, conexión con el cerebro) limitan la posibilidad de eclosionar en respuesta a estímulos mecánicos. Entre las especies estudiadas, neuromastos desarrollados aparecen a partir del estadio 24 (Figs. 5F y 8F), pero la relación con eclosión temprana inducida por estímulos sensoriales (predadores, vibraciones) no pudo ser explorada. En el caso de la eclosión por hipoxia, los embriones de *Agalychnis* son capaces de detectar cambios de oxígeno mucho antes de ser capaces de eclosionar (Warkentin *et al.* 2017). Resulta interesante en este caso, que la posibilidad de eclosionar está sujeta a la adquisición de competencia para efectuar la eclosión, aún cuando los mecanismos para detectar los estímulos ya están garantizados.

En peces y anuros, las glándulas de eclosión juegan un papel fundamental en la liberación de los embriones de las membranas del huevo (Nokhbatolfoghahai y

Downie, 2007). El mecanismo de eclosión y el rol que las células de eclosión desempeñan en él se conocen en detalle en embriones de *A. callidryas* (Cohen *et al.*, 2016; 2019). Estos embriones inician la salida del huevo mediante sacudidas laterales y movimientos del disco oral, durante los cuales las células de eclosión liberan enzimas que debilitan y producen la ruptura de la membrana vitelina. Finalmente, se liberan del huevo mediante movimientos musculares vigorosos. Los dos tipos de células de eclosión descritos en *Agalychnis callidryas* tienen un rol diferencial durante la eclosión. Las células de eclosión temprana permiten la eclosión del embrión del huevo al comienzo del período plástico y se sugiere entonces que son las responsables de la facultad de eclosionar tempranamente. Las células de eclosión tardía por su parte, están aparentemente involucradas en eventos de eclosión normal. En *Phyllomedusa* aparentemente sólo están presentes las células de eclosión temprana (Figs. 5A–C, 8B, 14), aunque esto debe ser confirmado analizando las demás especies del clado. Las células de eclosión tardía de *Agalychnis callidryas* posiblemente están presentes también en embriones de *Pithecopus azureus*. Esto implica que los mecanismos de eclosión posiblemente difieran entre géneros, al ser mediados por diferentes tipos de células. Las semejanzas entre *Agalychnis* y *Pithecopus* que incluyen, además de la eventual presencia de un segundo tipo de célula de eclosión, el arreglo en forma de herradura de las glándulas adhesivas, resultan un ejemplo muy interesante de evolución morfológica convergente en contextos ambientales muy diversos.

Por su parte, las glándulas adhesivas secretan proteínas mucosas que adhieren al embrión a superficies dentro y fuera del huevo (Nokhbatolfoghahai y Downie, 2005). Un rol posible de estas glándulas durante la eclosión fue inicialmente sugerido para *Xenopus laevis* por Bles (1905), quien propuso que las glándulas adhesivas mantendrían la región oral adherida a las membranas del huevo, dando tiempo a las enzimas proteolíticas de las glándulas de eclosión a actuar en la digestión. Filmaciones a alta velocidad de *Agalychnis callidryas* durante el momento de eclosión muestran que los embriones contactan la membrana vitelina (de fecundación) por unos segundos antes de eclosionar (Cohen *et al.*, 2016). Si las glándulas adhesivas están involucradas en este comportamiento debe ser explorado en detalle, y en este contexto, es de interés la comparación con el mecanismo en especies sin glándulas adhesivas, como *P. boliviana* y *P. trinitatis*.

La eclosión temprana induce un patrón morfológico en general compartido

Nuestros resultados en especies de *Phyllomedusa* son muy similares a lo encontrado por Warkentin (1999) en experimentos en *Agalychnis callidryas*. Al

momento de eclosionar, los embriones con eclosión precoz tienen menor tamaño, cola y musculatura caudal más bajas, branquias más grandes, disco oral y tracto digestivo menos desarrollados que los embriones que eclosionan más tarde (Fig. 46). En *Agalychnis*, estas diferencias inciden inmediatamente en la tasa de supervivencia ante depredadores (e.g., el menor desarrollo de la cola, pulmones y la región oral condicionan los comportamientos antidepredatorios) y en la adquisición de recursos (el retardo en el inicio de la alimentación activa se debe al desarrollo incompleto del disco, esqueleto hiobranquial y tracto digestivo). Sin embargo, el ingreso temprano al cuerpo de agua modifica varios aspectos de la morfología embrionaria y a lo largo del período plástico se observa que el desarrollo más extendido en el agua versus dentro del huevo marca diferencias en embriones de la misma edad. Las principales diferencias se manifiestan en el tamaño, sistema respiratorio y digestivo.

Los embriones que eclosionan tempranamente en ambas especies de *Phyllomedusa* aumentan de tamaño más marcadamente que los que permanecen en el huevo, especialmente un día después de eclosionar. Aspectos de la cola muestran una tendencia similar, resultando en embriones que a poco de eclosionar ya muestran colas más cortas, con aletas y musculatura más altas (ver Figs. 23 y 24). De la misma manera, embriones precoces de *Agalychnis*, con menor longitud total y musculatura caudal menos desarrollada, incrementan el tamaño corporal hasta 2 y 3 veces más rápido que los embriones que permanecen dentro de los huevos. La tasa de desarrollo acelerada involucra también principalmente la diferenciación del disco oral, el desarrollo del tracto digestivo, y la regresión de las branquias. Una vez que los embriones ingresan al agua, el disco oral comienza a desarrollarse más rápidamente comparado con los embriones que quedaron dentro del huevo. Cuando los embriones que continuaron su desarrollo dentro del huevo eclosionan varios días después, lo hacen con disco menos desarrollado comparado con las larvas de eclosión temprana que ya llevan varios días en el agua (Figs. 29 y 30). En embriones de *P. sauvagii*, estas diferencias se hacen menos evidentes a medida que disminuye la diferencia de edad de eclosión de los embriones entre tratamientos (Fig. 31). El tracto digestivo incrementa su longitud y las espiras se diferencian antes en embriones eclosionados tempranamente (Figs. 27 y 28). Respecto de las branquias, en los embriones eclosionados temprano estas estructuras comienzan su regresión antes que en sus pares en el huevo, aunque la regresión total de las mismas les toma hasta dos días después de producida la eclosión (Fig. 26). A diferencia de nuestros resultados, en *A. callidryas* las branquias de embriones con eclosión temprana son reabsorbidas completamente al día siguiente de que los embriones caen al agua (Warkentin, 1999).

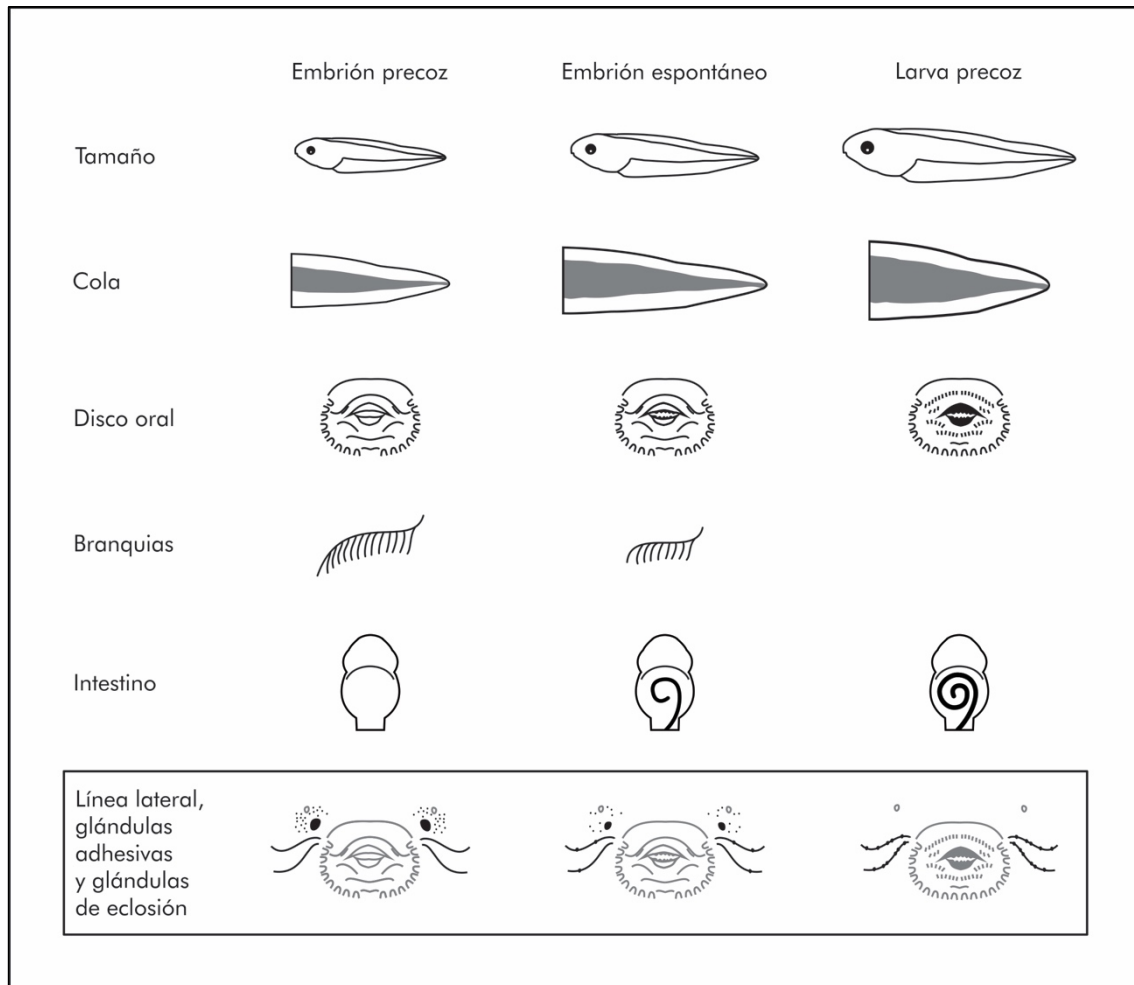


Figura 46. Resumen de las variaciones morfológicas en embriones de *Phyllomedusa boliviana* y *P. sauvagii* según la edad de eclosión. La primera columna esquematiza la morfología de embriones eclosionados tempranamente (a 7 y 4–5 días respectivamente). La columna del medio corresponde a embriones eclosionados en condiciones normales (espontáneamente a los 9 y 6–7 días). La columna titulada larvas precoces muestra especímenes contemporáneos a los eclosionados espontáneamente, pero que por eclosionar de manera precoz llevan más tiempo en medio acuático. El recuadro muestra un patrón esbozado en líneas laterales y estructuras glandulares, observaciones que deben ser verificadas con muestras más amplias. Nótese el desarrollo más rápido en las larvas eclosionadas precozmente, que involucra varios sistemas de caracteres.

La regresión de las glándulas adhesivas y de eclosión, y el desarrollo de las líneas laterales parece ocurrir también más rápido en el agua, pero esto debe ser confirmado con observaciones más detalladas (Figs. 30 y 32–33). Luego de eclosionar, los embriones de los phyllomedusidos frecuentemente se adhieren a la capa superficial del agua, suspendidos por sus discos orales (e.g., Kenny, 1968; Warkentin, 1999). Los embriones de *A. callidryas* que eclosionan temprano no pueden efectuar este comportamiento por el pobre desarrollo del disco oral, pero se adhieren a

superficies dentro del agua mediante sus glándulas adhesivas muy desarrolladas (Warkentin, 1999). En embriones de *Xenopus laevis*, Lambert *et al.* (2004) demostraron que mientras los embriones están adheridos a alguna superficie, la actividad natatoria y la respuesta a estímulos que inician la natación se reducen por períodos largos de tiempo; los embriones que no se mueven son menos susceptibles a ser detectados y el riesgo de depredación decrece. Dadas estas observaciones, en embriones sin glándulas adhesivas, como los de *P. boliviana*, esperaríamos algún mecanismo compensatorio (e.g., un desarrollo más temprano de mecanismos de flotación o locomoción) en embriones que eclosionan temprano.

Según Warkentin (1999), las tasas más aceleradas de desarrollo en el agua que dentro del huevo se deben al cambio de ambiente, que afecta el crecimiento y la diferenciación de manera directa. La explicación fisiológica para las diferencias en las tasas de desarrollo, en especímenes que aún no se alimentan, se relaciona con una conversión más rápida del vitelo en tejido, por lo que Warkentin (1999) postula que factores que afectan las tasas metabólicas intervienen principalmente. La autora no encuentra evidencia de un rol de la temperatura y concluye que la mayor disponibilidad de oxígeno (no limitada por las cápsulas del huevo luego de la eclosión) favorece el desarrollo más rápido en el agua. Las branquias son particularmente sensibles a estos cambios, tal como lo demuestra Warkentin (2000b; 2007) en estudios posteriores en los que logra reducir totalmente las branquias de embriones no eclosionados al aumentar el área de superficie expuesta del huevo. La reducción casi inmediata de las branquias externas una vez en el agua se asocia a la adquisición de funcionalidad de las branquias internas y la facultad de respiración aérea. Por otra parte, resulta una ventaja para la locomoción eliminar estructuras que pueden causar arrastre y ser fácilmente dañadas.

Nuestros resultados coinciden también con los obtenidos en *Agalychnis*, en relación a las variaciones en la forma del cuerpo de embriones con eclosión temprana. A diferencia de los cambios en tamaño y desarrollo del disco oral y tracto digestivo, que simplemente ocurren aceleradamente respecto de los tiempos en embriones pre-eclosión, la forma de la cola muestra una trayectoria de cambio divergente en embriones precoces. Warkentin (1999) interpreta estos cambios como respuestas adaptativas al cambio de ambiente. Por un lado, las colas relativamente más cortas y altas de los embriones eclosionados tempranamente pueden funcionar incrementando la superficie para intercambio gaseoso cutáneo. La explicación alternativa se relaciona con la potencial presión de depredación en el agua y será retomada en el apartado siguiente.

DESARROLLO A LA METAMORFOSIS Y CONSECUENCIAS A LARGO PLAZO DE LA ECLOSIÓN PLÁSTICA

Nuestros resultados sugieren que la etapa larval es un período altamente plástico en *Phyllomedusa boliviana* y *P. sauvagii*. Las larvas alteran su fenotipo a lo largo de la ontogenia ante cambios ambientales y las respuestas varían dependiendo de la especie, el tipo de estímulo y la edad de eclosión. La Tabla 37 muestra resumidamente los resultados de los experimentos realizados, a fin de discutir los efectos individuales y combinados de las variables consideradas. Nuestros experimentos y la comparación con los resultados obtenidos en otras especies permiten discutir semejanzas y diferencias en cuanto a las consecuencias que la eclosión plástica tiene en el desarrollo a largo plazo, la plasticidad fenotípica durante la etapa larval y la interacción entre ambos factores. Estos temas serán resumidos a continuación. Una aclaración importante es que consideramos que el número de nidos usados para realizar los experimentos fue bajo, debido a las dificultades que se tuvo para coleccionar nidos recientes. Por este motivo, no pudimos incluir en nuestros experimentos individuos provenientes de diferentes nidos para cada réplica, y de esta forma evitar un posible factor genético que confunda posibles patrones en nuestros resultados (ver Gibbons y George, 2012). Sin embargo, consideramos que nuestros datos son sumamente relevantes por lo inédito y por las semejanzas con lo que ocurre en especies estudiadas siguiendo aproximaciones más robustas.

La eclosión temprana combina efectos transitorios y duraderos en el desarrollo larval

Si bien al inicio los embriones precoces tienen una cierta ventaja de tamaño y desarrollo de varios caracteres respecto de embriones eclosionados espontáneamente, rápidamente las diferencias desaparecen (Fig. 25). En *P. sauvagii* las semejanzas se mantienen y los renacuajos alcanzan la metamorfosis en tiempo y tamaño comparables (Tabla 37). Tiempos de metamorfosis invariables en larvas con eclosión plástica se reportan también para otras especies (Capellán y Nicieza, 2007; Touchon *et al.*, 2013). Por el contrario, en *P. boliviana* los renacuajos eclosionados tempranamente retardan la diferenciación de estadios y la metamorfosis ocurre más tarde y a mayor tamaño que en las larvas de la misma edad con eclosión normal (Fig. 47; Tabla 37). En esta especie además se observa una tendencia consistente a que larvas con eclosión temprana inician la metamorfosis, es decir emergen del agua, con la cola más musculosa y con aletas más altas (i.e., menos reducida) que individuos control.

Tabla 37. Resumen de los efectos más significativos de la edad de eclosión, las señales de depredación e hidroperíodo decreciente en el crecimiento (tamaño), desarrollo (forma) y metamorfosis (edad y tamaño) de larvas de *Phyllomedusa boliviana* y *P. sauvagii*. Los efectos del tratamiento eclosión temprana combinan resultados obtenidos en cría en bandejas para *P. sauvagii* (el único disponible) y mesocosmos en *P. boliviana* (las condiciones más óptimas). Las flechas indican incremento o reducción de las variables consignadas, al inicio o fin del desarrollo. (-) No testeado.

<i>P. boliviana</i>				<i>P. sauvagii</i>		
Efecto	Tamaño	Forma	Metamorfosis	Tamaño	Forma	Metamorfosis
Eclosión temprana	↓ inicio	↑ fin aleta/músculos cola	↑ edad ↑ tamaño	↓ inicio	↑ medio largo cuerpo aleta	no
Depredador	↓ inicio	↑ fin aleta/músculos cola	↑ edad ↑ tamaño	↓ inicio	↑ inicio-fin músculos cola	no
Dsecación	no	↑ inicio-fin músculos cola	no	↓ inicio	↑ fin cuerpo y cola	no
Depredador x Eclosión	positiva ↓ inicio	no	negativa ↓ edad	-	-	-
Dsecación x Eclosión	no	no	no	positiva ↓ inicio-fin	negativa ↓ fin largo cuerpo	no

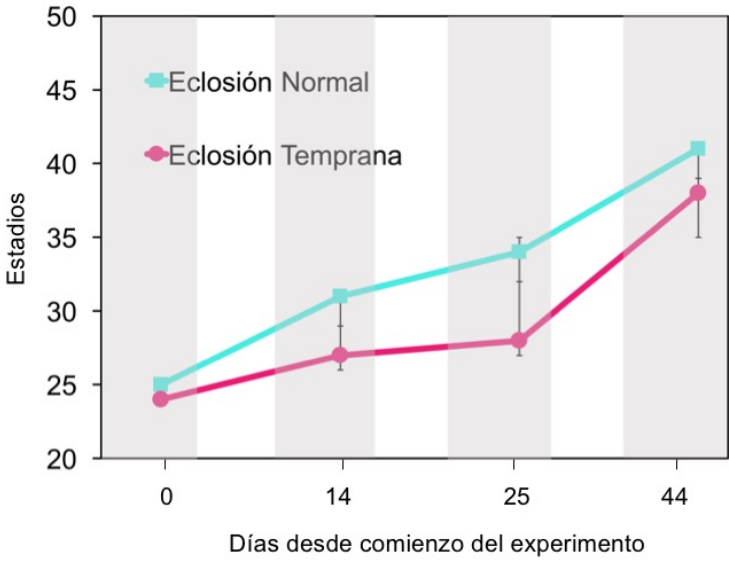


Figura 47. Progresión de estadios de desarrollo (Gosner, 1960) en larvas de *Phyllomedusa boliviana* que eclosionaron normal y precozmente.

Los resultados en *P. boliviana* son en parte comparables a los obtenidos por Touchon *et al.* (2013) en experimentos con *Agalychnis callidryas*. Estos autores encuentran que los cambios morfológicos que inicialmente se aceleran en embriones con eclosión temprana son transitorios, pero otros tienen efectos duraderos y rastreables hasta la metamorfosis. La eclosión temprana en esta especie implica una mayor mortalidad durante la etapa larval, pero los especímenes sobrevivientes emergen del agua con colas más largas y metamorfosean a mayor tamaño. Resulta interesante que estos cambios fenotípicos en los metamorfos continúan implicando un efecto arrastre luego de la metamorfosis: es conocido que colas más largas reducen la eficiencia del salto en tierra (e.g., Wassersug y Sperry, 1977) y esto puede afectar la supervivencia en la vida postmetamórfica.

El crecimiento y desarrollo larval se modifican ante factores bióticos y abióticos

Las larvas de *Phyllomedusa boliviana* y *P. sauvagii* modifican aspectos fenotípicos ante estímulos de depredación y desecación, pero la susceptibilidad a los estímulos y el lapso de la ontogenia larval en que se concentran las respuestas varía interespecíficamente.

Las señales de depredación provocan una respuesta morfológica conservada al inicio de la etapa larval

Las larvas de *Phyllomedusa boliviana* y *P. sauvagii* criadas en presencia de depredadores disminuyen inicialmente de tamaño (ver Figs. 40–41 y resumen en Tabla 37). Para el mismo momento del desarrollo, estas reducciones representan un 10% y 17% del tamaño corporal para *P. boliviana* y *P. sauvagii* respectivamente. Un menor crecimiento en respuesta a la presencia de depredadores ha sido documentado en varias larvas de anuros (e.g., Bernard, 2004; Touchon *et al.*, 2013; Jara, 2010). Esta respuesta está relacionada con una disminución en la actividad de forrajeo, con el propósito de reducir el riesgo de depredación (McNamara y Houston, 1994). Un menor crecimiento larval conlleva costos que pueden afectar etapas posteriores, como una menor supervivencia después de la metamorfosis y menor tamaño en el momento que se produce el primer evento reproductivo (Semlitsch *et al.*, 1988). En las especies bajo estudio, reducir la actividad sólo al comienzo de la etapa larval ante presencia de señales de depredación, coincidiendo con el período de mayor vulnerabilidad, parece una buena estrategia para reducir el riesgo de depredación y sus costos asociados.

En nuestro estudio, además de un efecto general sobre el crecimiento, también encontramos que las señales de depredación inducen diferencias en las dimensiones

de la musculatura y aletas caudales (Figs. 40–41 y Tabla 37). Gran parte de los estudios realizados en anuros revelan que en general las larvas incrementan la altura de la cola ante la presencia de depredadores (revisión en Bernard, 2004). Relyea (2001) realiza un estudio en 6 especies y encuentra que las respuestas morfológicas y comportamentales suelen ser específicas dependiendo del depredador. Los depredadores a los que se enfrentan las larvas presentan diferentes modos de forrajeo, algunos realizan búsqueda activa, otros presentan una estrategia “sit-and-wait”, entre otros. De esta forma, los cambios morfológicos que mejoran la capacidad natatoria pueden ser adaptativos dependiendo del tipo de depredador. En general, una aleta caudal más desarrollada mejora el escape ante depredadores con estrategia “sit-and-wait”, pero disminuye la velocidad general de natación, y por lo tanto estos renacuajos son menos eficaces para escapar de depredadores que persiguen a sus presas (Van Buskirk y McCollum, 2000). En nuestro estudio, las larvas de Odonata de la familia Aeshnidae presentan, al igual que la mayoría de las larvas de libélulas, una estrategia “sit-and-wait” (Corbert, 1999). Las colas más grandes también pueden funcionar como señuelos para dispersar la atención y evitar que el ataque se concentre en zonas más vulnerables del cuerpo (Van Buskirk *et al.*, 2003). Sin embargo, los cambios morfológicos en respuesta a depredadores no siempre son adaptativos. Por ejemplo, Perotti *et al.* (2016) no encontraron evidencias de que los cambios inducidos por depredadores en larvas de *Pleurodema thaul* mejoren el desempeño (performance) de la especie. Por otra parte, larvas de *A. callidryas* con colas dañadas por peces logran compensarlo y presentan las mismas capacidades natatorias que larvas con colas enteras (Touchon y Wojdak, 2014). La misma respuesta compensatoria aparece en larvas de la misma especie con menor musculatura caudal, que incrementan el esfuerzo locomotor igualando la desempeño de individuos control (Touchon y Wojdak, 2014).

En nuestro estudio, el aumento de la altura de la aleta y de la musculatura caudal en larvas de *Phyllomedusa boliviana* sometidas a señales de depredación se concentra al final del desarrollo larval (Fig. 40D,E y Tabla 37). Alterar la morfología de la cola cuando se acerca la metamorfosis no pareciera tener un valor ecológico o adaptativo. En especial teniendo en cuenta que la mayor vulnerabilidad a los depredadores se concentra en etapas en las que las larvas son más pequeñas (Alford, 1999). Las larvas de *P. sauvagii* en cambio aumentan la musculatura caudal desde el inicio hasta el final del desarrollo, atravesando entonces el período de mayor vulnerabilidad con una morfología posiblemente ventajosa (Fig. 41D y Tabla 37). Los depredadores usados en este estudio fueron colectados en los mismos sitios de muestreo de *P. sauvagii*. Si bien no se descarta que los mismos depredadores se

encuentren en los charcos que habita *P. boliviana*, la mayor reactividad de *P. sauvagii* podría estar relacionada a la coexistencia habitual.

La mayoría de los estudios acerca de efectos de depredación sobre larvas de anuros suele enfocarse en etapas puntuales del desarrollo. En nuestro estudio, realizamos un seguimiento de todo el desarrollo larval, lo que nos permitió registrar a lo largo del tiempo los diferentes cambios fenotípicos que se dan en respuesta a la presencia de depredadores. Estudios similares realizados a lo largo de la ontogenia larval muestran que al comienzo las larvas reducen la actividad y recién más tarde presentan cambios en la morfología (Relyea, 2003). Dejando aparte el efecto inicial sobre el tamaño, nuestros resultados coinciden en general con este patrón y en ambas especies bajo estudio los cambios en las variables de forma del cuerpo se acentúan al final del desarrollo. Los cambios comportamentales, como la reducción de actividad, implican mayores costos en términos de crecimiento en comparación con cambios morfológicos (Relyea, 2003). Relyea (2001) encuentra que especies de charcos temporarios presentan mayores respuestas morfológicas que comportamentales para evitar una reducción del crecimiento que les impida llegar a la metamorfosis.

La presencia de depredadores puede incidir en la duración de la etapa larval y el tamaño con el que ocurre la metamorfosis. La hipótesis más difundida asume que las larvas ante el riesgo de depredación metamorfosean antes y con un menor tamaño. En nuestro estudio, las larvas de *P. boliviana* criadas en presencia de depredadores metamorfosean a mayor tiempo y tamaño, mientras que las de *P. sauvagii* llegan a la metamorfosis en iguales condiciones que los renacuajos criados sin señales de depredación (Fig. 42 y Tabla 37). Estudios en otras especies también muestran resultados diversos. En la revisión realizada por Bernard (2004), de un total de 23 estudios en anfibios, sólo en dos especies (*Bufo bufo* y *Bufo boreas*) las larvas metamorfosearon antes pero con el mismo tamaño (Laurila *et al.*, 1998, Chivers *et al.*, 1999; ver también Vonesh y Warkentin, 2006; Touchon *et al.*, 2013). En 10 estudios las larvas emergen de los charcos con un menor tamaño pero al mismo tiempo o más tarde y en 6 estudios las respuestas son similares a la de *P. boliviana* invirtiendo completamente lo predicho. En un porcentaje de estudios, no hay efecto de la depredación en el tiempo y tamaño en el que ocurre la metamorfosis. Esto sugiere, como se retomará en la última sección, que un sin número de factores pueden combinarse e influir sobre el desarrollo larval y mantener o modificar respuestas finales como aspectos de la metamorfosis depende de un sistema complejo de interacciones ecológicas y comportamentales (Bernard, 2004).

La respuesta a cambios en el hidroperíodo varía interespecíficamente

Las larvas de *Phyllomedusa sauvagii* criadas en condiciones de desecación disminuyen inicialmente su tamaño, mientras que las de *P. boliviana* no se ven afectadas (Figs. 43–44 y resumen en Tabla 37). Durante el transcurso del desarrollo las larvas de *P. sauvagii* se equiparan a las larvas en condiciones estables y, tal como los renacuajos de *P. boliviana* metamorfosean en tiempo y tamaño similares a los controles (Fig. 45 y Tabla 37). Estudios experimentales previos muestran que la respuesta de larvas de anuros ante la desecación varía de acuerdo a la especie. En algunas especies las larvas tienden a metamorfosear antes y con un menor tamaño en respuesta a la reducción en el volumen de agua (e.g. *Rana temporaria* Laurila y Kujasalo, 1999; *Pleurodema thaul* y *P. bufoninum*, Perotti *et al.*, 2011). En otras, adelantan el tiempo de metamorfosis pero no el tamaño (*Rhinella spinulosa*, Perotti *et al.*, 2011; *Rana temporaria*, Loman, 1999). Y finalmente en otras especies no hay diferencias en el tiempo y tamaño de metamorfosis (Richter-Boix *et al.*, 2006). En general, las especies que explotan una mayor variedad de ambientes, incluidos ambientes temporarios, tienden a reducir la duración de la etapa larval en respuesta a la desecación (Richter-Boix *et al.*, 2006). Sin embargo, en esta Tesis no encontramos estas diferencias en las especies bajo estudio.

Con respecto a las variables referidas a la forma, las larvas de ambas especies se acercan a la metamorfosis con mayor musculatura caudal y aletas más altas (Figs. 43D,E y 44D,E, y Tabla 37). Otros estudios realizados en larvas de anuros sobre cambios morfológicos en respuesta al riesgo de desecación solo reportan efectos en etapas posteriores. Por ejemplo, larvas expuestas a riesgo de desecación metamorfosean con miembros posteriores más cortos (*Scaphiopus couchii*, Newman 1989; *Rhinella spinulosa*, Márquez-García *et al.*, 2009).

Para que las larvas expuestas a un hidroperíodo decreciente respondan de manera adaptativa al riesgo de desecación, deben ser capaces de reconocer diferentes señales ambientales que indican que el charco está próximo a secarse. Éstas señales incluyen: mayor temperatura, mayor densidad, cambios en la concentración de solutos y menor volumen de agua (Brady y Griffiths, 2000). En nuestros experimentos no consideramos la temperatura ni la concentración de solutos. La densidad de larvas fue muy variable a lo largo del experimento, dado que si bien todos los tratamientos comenzaron en las mismas condiciones, la alta mortalidad durante las pruebas generó una disminución paulatina del número de larvas. Dada la relación inversa conocida entre tamaño corporal densidad larvales, es necesario cuantificar este efecto para poder discutir adecuadamente la relación entre variaciones de tamaño y cambios en el hidroperíodo.

El efecto conjunto de la eclosión temprana y los riesgos de la vida larval no persiste hasta la metamorfosis

Los experimentos realizados sugieren que el efecto de las señales de depredación e hidroperíodo decreciente depende del momento de eclosión en *Phyllomedusa*. En *P. boliviana*, la disminución de tamaño producto de la presencia de depredadores se acentúa en embriones eclosionados precozmente (Tablas 11 y 37). De la misma manera, la disminución de tamaño inicial en *P. sauvagii* inducida por un hidroperíodo decreciente es más evidente en embriones que eclosionaron tempranamente (Tablas 29 y 37). Esto indica que aún cuando los embriones con eclosión precoz al principio aumentan sus tasas de desarrollo en el agua, esto no compensa los efectos de factores de riesgo y al inicio de la etapa larval persisten con menores tamaños. Es sabido que las náyades de Odonata disminuyen la presión de depredación a medida que aumenta el tamaño de las presas (Alford, 1999), por lo tanto la eclosión temprana conlleva mayores riesgos en el medio acuático.

Por el contrario, en otras especies se insinúa un efecto ventajoso de la eclosión temprana ante la depredación (Vonesh y Bolker, 2005). En particular en *Agalychnis*, Wojdak *et al.* (2014) muestran que las larvas, aún en caso de ingresar al ambiente acuático con un menor tamaño exhiben un crecimiento y desarrollo sostenidamente más rápidos en presencia de ciertos depredadores. Esto ocurre ante chinches de agua y peces, mientras que las náyades de Odonata, aunque reducen la supervivencia de las larvas durante todo el desarrollo, no inducen cambios significativos en su tamaño. Estos autores también encuentran que los efectos individuales de los depredadores se diluyen en ensambles múltiples, donde cambios en los comportamientos depredatorios y la depredación intra-gremio (i.e., entre depredadores) inciden indirectamente sobre el desarrollo de las larvas. La falta de respuesta diferenciada al final del desarrollo sugiere que los efectos latentes de la eclosión temprana desaparecen en condiciones naturales.

Además del tamaño, los cambios en las condiciones de depredación e hidroperíodo modifican aspectos de la forma larval de *Phyllomedusa*, fundamentalmente de la cola. Estas transformaciones sin embargo en general no cambian según la edad de eclosión (Tabla 37). Warkentin (1999) y Touchon y Wojdak (2014) encuentran que las larvas de *Agalychnis* alteran dimensiones de la cola en presencia de diferentes depredadores, pero a diferencia de *Phyllomedusa boliviana* las respuestas son específicas dependiendo de cuándo eclosionan. Las larvas con eclosión precoz presentan colas más largas y aletas caudales más altas en presencia de depredadores y se vuelven menos vulnerables a camarones dulceacuícolas. Sin

embargo, como ocurría con el tamaño, el efecto de la edad de eclosión sobre la morfología de la cola desaparece cuando las larvas están en presencia de varios depredadores sincrónicamente.

Hacia el final del desarrollo, la crianza bajo señales de depredación revierte el efecto de la eclosión temprana en la duración de la etapa larval de *Phyllomedusa boliviana*, y los especímenes eclosionados precozmente alcanzan la metamorfosis antes (Tablas 19 y 37). Una permanencia más corta en el ambiente acuático reduce la exposición a riesgos propios de la vida larval, al tiempo que puede adelantar los riesgos de la etapa postmetamórfica. Por su parte, los renacuajos de *P. sauvagii* metamorfosean al mismo tiempo independientemente de su edad de eclosión, presencia de depredadores y riesgo de desecación (Tablas 22 y 37). Estudios en otras especies muestran resultados similares: aún con consecuencias a corto plazo de la plasticidad de eclosión, los riesgos de depredación y sus efectos combinados, los tamaños y tiempos en que se alcanza la metamorfosis no cambian (e.g., Warkentin, 1999; Touchon *et al.*, 2013). Otros factores, como la disponibilidad de recursos, pueden afectar esta ecuación, resultando metamorfos de pequeño tamaño en cohortes con eclosión temprana criadas en presencia de depredadores (Touchon *et al.*, 2013).

Por su parte, la relación entre el riesgo de desecación y la edad de eclosión no fue abordada hasta el momento en otras especies. La combinación de un efecto inicial desventajoso, con falta de efecto a la metamorfosis en *Phyllomedusa sauvagii* es similar a lo que ocurre con *P. boliviana* en condiciones de depredación y apunta como en otras especies, a mecanismos compensatorios durante el desarrollo larval. En *P. sauvagii* adicionalmente, la falta de efectos en general puede deberse a una resiliencia intrínseca de esta especie, relacionada a los ambientes más inestables en que ocurre. Alternativamente, podría ocurrir que la desecación sea un riesgo poco frecuente en los ambientes naturales donde ambas especies se desarrollan. Si bien *P. sauvagii* se encuentra más ampliamente distribuida y explota una gran variedad de ambientes en comparación con *P. boliviana*, en general, ambas especies necesitan de cierta estructura del charco (e.g., profundidad, recursos tróficos) para desarrollarse hasta la metamorfosis, principalmente debido a la prolongada duración de la etapa larval. En este contexto, para que un fenotipo plástico sea favorecido sería necesario que las especies estén expuestas a variaciones ambientales de manera frecuente, ya que el costo de mantener un fenotipo plástico puede superar el beneficio de poder responder adecuadamente a una condición rara. Los efectos de los cambios del hidroperíodo deben ser explorados más profundamente, dado que son particularmente relevantes en un contexto general de cambios climáticos y antrópicos actuales.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Esta Tesis representa un trabajo inédito en la región y contempla diversos enfoques, desde morfológicos y ontogenéticos, hasta ecológicos y comportamentales. La integración de varias etapas del desarrollo nos permite ampliar la comprensión que se tiene acerca de ciclos de vida complejos y cómo los individuos ajustan su fenotipo en respuesta a variaciones ambientales y acumulan consecuencias que son evidentes sólo en etapas posteriores del desarrollo.

Los hallazgos principales en *Phyllomedusa boliviana* y *P. sauvagii*, contextualizados en el marco de la información disponible para otros phyllomedusidos y larvas de anuros en general, se resumen a continuación. En general las hipótesis de trabajo de esta tesis, formuladas con base en antecedentes en formas relacionadas, se verifican en las especies estudiadas.

Desarrollo normal. La ontogenia temprana y la eclosión en condiciones no perturbadas es similar entre los phyllomedusidos, con un conjunto de caracteres conservados en la familia (la morfología y ontogenia de las branquias externas, el arreglo y secuencia de desarrollo de los elementos del disco oral, la disposición única de las células de la glándula de eclosión) y otros particularmente variables interespecíficamente (la presencia y estructura de las glándulas adhesivas, la presencia de diferentes tipos de células de eclosión). La eclosión normal, como en otros embriones de desarrollo terrestre, es comparativamente tardía.

Plasticidad de eclosión. Como todos los phyllomedusidos conocidos, las larvas de *P. boliviana* y *P. sauvagii* presentan la facultad de eclosionar anticipadamente ante estímulos ambientales. Sin embargo, esta plasticidad puede variar en al menos tres aspectos. Por un lado, los estímulos que provocan eclosión temprana difieren interespecíficamente. La respuesta a la hipoxia por inundación está conservada en la familia, mientras que la respuesta ante depredadores o patógenos al momento no está demostrada en *Phyllomedusa*. La respuesta a precipitaciones en las especies de nuestro estudio debe ser explorada con un diseño metodológico más ajustado. En segundo lugar, la extensión del período plástico en las especies de este estudio difiere de lo reportado en otros phyllomedusidos, dado que en ninguna de las dos especies la eclosión es tan extrema en tiempo y estadios de desarrollo. En relación a esto, el mecanismo de eclosión y las estructuras morfológicas involucradas posiblemente difieran interespecíficamente. El sistema de comportamientos y aspectos fisiológicos relacionados a la detección de estímulos y a la liberación de las membranas del huevo, conocido detalladamente en embriones de *Agalychnis*, en

principio sería diferente en embriones de *Phyllomedusa* con aparente ausencia de uno de los tipos de células de eclosión, y dentro del género, en *P. boliviana* y otras especies sin glándulas adhesivas. Finalmente, la eclosión temprana induce un patrón morfológico en general compartido entre las especies que presentan plasticidad de eclosión. Los embriones que eclosionan precozmente muestran un menor desarrollo que los que eclosionarán normalmente, pero el ingreso temprano al agua acelera el incremento de tamaño y desarrollo del sistema respiratorio (las branquias externas regresan antes) y digestivo (el disco oral se queratiniza y las espiras del tracto se forman más rápidamente). Estas tasas de crecimiento y desarrollo aceleradas durante esta etapa temprana y vulnerable son interpretadas por algunos autores en términos de modificaciones fisiológicas por cambios en el tipo de ambiente y como una respuesta adaptativa que compensa la vulnerabilidad. Estas diferencias sin embargo son transitorias, desdibujándose a medida que avanza el desarrollo. En cambio, aspectos como modificaciones en la forma de la cola persisten hasta el final del desarrollo y determinan fenotipos variables al inicio de la metamorfosis.

Plasticidad en las larvas. Nuestros resultados, aunque muy preliminares por problemas de diseño/muestreo, sugieren que la etapa larval es un período altamente plástico en *Phyllomedusa boliviana* y *P. sauvagii*. Las larvas alteran su fenotipo a lo largo de la ontogenia ante cambios ambientales y las respuestas varían dependiendo de la especie, el tipo de estímulo y la edad de eclosión. Mientras que *P. boliviana* parece ser más susceptible a las señales de depredación, las larvas de *P. sauvagii* muestran más cambios en su desarrollo asociados al hidropériodo decreciente. Las señales de depredación provocan una respuesta morfológica conservada al inicio de la etapa larval, con larvas de menor tamaño y colas más altas en presencia de depredadores. En *P. boliviana* esto redundaría en que el desarrollo se extiende y las larvas metamorfosean más tarde y con mayores tamaños, mientras que en *P. sauvagii* las condiciones de depredación no inciden en el fenotipo de los metamorfos. Por su parte la respuesta a cambios en el hidropériodo varía interespecíficamente: mientras las larvas de *P. sauvagii* disminuyen inicialmente su tamaño en condiciones de desecación, las de *P. boliviana* no se ven afectadas.

Efectos acumulados de la eclosión plástica y la plasticidad larval y potenciales consecuencias en la vida postmetamórfica. A diferencia de otras especies donde se advierten efectos ventajosos de la eclosión temprana en larvas expuestas a predadores, en *P. boliviana* y *P. sauvagii* eclosionar precozmente aparentemente tiene consecuencias negativas al acumularse con los efectos de las señales de depredación y desecación, resultando larvas que decrecen su crecimiento en tales condiciones. Sin embargo, contrariamente a lo esperado, posiblemente este

efecto conjunto no persiste hasta la metamorfosis. Por su parte, los cambios referidos a la forma, fundamentalmente de la cola, en respuesta a señales de depredación y de desecación no se ven afectados por la edad de eclosión. Por último, la edad de metamorfosis parece estar influenciada por la edad de eclosión solo en *P. boliviana* en condiciones de depredación, con larvas tempranas emergiendo antes del medio acuático.

Esta Tesis sienta las bases para futuras líneas de investigación que exploren cómo las respuestas tempranas que se dan en el desarrollo afectan respuestas en etapas más avanzadas. Y en especial, en un contexto de profundos cambios antrópicos, se hacen necesarios estudios de este tipo que permitan entender cómo organismos con ciclos de vida complejo ajustan su fenotipo frente a variaciones en el ambiente.

LITERATURA

- Agar WE. 1909. The Nesting Habits of the Tree-Frog *Phyllomedusa sauvagii*. Proceedings of the Zoological Society of London. 1909: 893–897.
- Alford RA. 1999. Ecology: resource use, competition, and predation. En: Tadpoles. The biology of anuran larvae. (Editores: RW McDiarmid y R Altig). The University of Chicago Press, Chicago, USA. pp 240–278.
- Altig R y McDiarmid RW. 1999. Body plan: Development and morphology. En: Tadpoles. The biology of anuran larvae. (Editores: RW McDiarmid y R Altig). The University of Chicago Press, Chicago, USA. pp 24–51.
- Altwegg R y Reyer HU. 2003. Patterns of natural selection on size at metamorphosis in water frogs. *Evolution* 57(4): 872–882.
- Anderson AS, Monasterio C y Schoo L. 2010. Breeding behaviour of the poorly known Australian hylid frog *Litoria longirostris*. *Herpetofauna* 40: 9–12.
- Anholt BR y Werner EE. 1995. Interaction between food availability and predation mortality mediated by adaptive behavior. *Ecology* 76(7): 2230–2234.
- Anstis M. 2007. Tadpoles of South-eastern Australia. New Holland Publishers, Sydney, Australia.
- Anstis M, Tyler MJ, Roberts JD, Price LC y Doughty P. 2010. A new species of *Litoria* (Anura: Hylidae) with a highly distinctive tadpole from the north-western Kimberley region of Western Australia. *Zootaxa* 2550: 39–57.
- Ball SL y Baker RL. 1996. Predator--Induced Life History Changes: Antipredator Behavior Costs or Facultative Life History Shifts? *Ecology* 77(4): 1116–1124.
- Barrio A. 1976. Estudio cariotípico y análisis audioespectrográfico de los cantos de las especies de *Phyllomedusa* (Anura, Hylidae) que habitan en la Argentina. *Physis* 35: 65–74.
- Benard MF. 2004. Predator-induced phenotypic plasticity in organisms with complex life histories. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 35: 651–673.
- Bles EJ. 1905. The life history of *Xenopus laevis* Daud. *Transactions of the Royal Society of Edinburgh* 41:789–821.
- Brady LD y Griffiths RA. 2000. Developmental responses to pond desiccation in tadpoles of the *British anuran amphibians* (*Bufo bufo*, *B. calamita* and *Rana temporaria*). *Journal of Zoology* 252(1): 61-69.
- Budgett JS. 1899. Notes on the batrachians of the Paraguayan Chaco, with observations upon their breeding habits and development, especially with

- regard to *Phyllomedusa hypochondrialis*, Cope. Also a description of a new genus. Quarterly Journal of Microscopical Science 42: 305–333.
- Caldwell MS, McDaniel JG y Warkentin KM. 2009. Frequency information in the vibration-cued escape hatching of red-eyed treefrogs. Journal of Experimental Biology 212(4): 566–575.
- Calef GW. 1973. Natural mortality of tadpoles in a population of *Rana aurora*. Ecology 54:741–758.
- Cannatella DC. 1983. Synonymy and distribution of *Phyllomedusa boliviana* Boulenger (Anura, Hylidae). Proceedings of the Biological Society of Washington 96: 59–66.
- Cannatella D y De Sá RO. 1993. *Xenopus laevis* as a model organism. Systematic Biology 42: 476–507.
- Capellán E y Nicieza AG. 2007. Trade-offs across life stages: does predator-induced hatching plasticity reduce anuran post-metamorphic performance?. Evolutionary Ecology 21(4): 445–458.
- Cei JM. 1980. Amphibians of Argentina (Vol. 2). Università degli Studi di Firenze.
- Chipman AD. 2002. Variation, plasticity and modularity in anuran development. Zoology 105: 97–104.
- Chipman AD, Haas A y Khaner O. 1999. Variation in anuran embryogenesis: yolk rich embryos of *Hyperolius puncticulatus*. Evolution & Development 1: 49–61.
- Chipman AD, Haas A, Tchernov E y Khaner O. 2000. Variation in anuran embryogenesis: differences in sequence and timing of early developmental events. Journal of Experimental Zoology 288: 352–365.
- Chivers DP, Kiesecker JM, Wildy EL, Belden LK, Kats LB y Blaustein AR. 1999. Avoidance response of post-metamorphic anurans to cues of injured conspecifics and predators. Journal of Herpetology 1999: 472–476.
- Cohen KL, Seid MA y Warkentin KM. 2016. How embryos escape from danger: the mechanism of rapid, plastic hatching in red-eyed treefrogs. Journal of Experimental Biology 219: 1875–1883.
- Cohen KL, Piacentino ML y Warkentin KM. 2019. Two types of hatching gland cells facilitate escape-hatching at different developmental stages in red-eyed treefrogs, *Agalychnis callidryas* (Anura: Phyllomedusidae). Biological Journal of the Linnean Society 2019: 1–17.
- Costa PN y Carvalho e Silva AMT. 2008. Ontogenia e aspectos comportamentais da larva de *Phasmahyla guttata* (Lutz, 1924) (Amphibia, Anura, Hylidae). Biota Neotropica 8: 219–224.

- Costa PN, Carvalho e Silva AMT y Flaskman A. 2010. Egg clutch and larval development of *Phasmahyla cruzi* Carvalho-e-Silva, Silva and Carvalho-e-Silva, 2009 (Amphibia, Anura, Hylidae). *Herpetology Notes* 3: 221–228.
- Corbet PS. 1999. Dragonflies – Behaviour and Ecology of Odonata. Harley Books, Colchester, 829 pp.
- Crump ML. 1989. Effect of habitat drying on developmental time and size at metamorphosis in *Hyla pseudopuma*. *Copeia* 1989(3): 794–797.
- Cuello ME, Úbeda CA, Bello MT y Perotti MG. 2014. Plastic patterns in larval development of Endangered endemic *Atelognathus patagonicus*: implications for conservation strategies. *Endangered Species Research* 23(1): 83–92.
- Davies M. 1989. Developmental biology of the australopapuan hylid frog *Litoria eucnemis* (Anura: Hylidae). *Transactions of the Royal Society of South Australia* 113: 215–220.
- Davies M y Richards SJ. 1990. Developmental biology of the australian hylid frog *Nyctimystes dayi* (Günther). *Transactions of the Royal Society of South Australia* 114: 207–211.
- De Bavay JM. 1993. The developmental stages of the sphagnum frog, *Kyarranus sphagnicolous* Moore (Anura, Myobatrachidae). *Australian Journal of Zoology* 41: 151–201.
- Dias TM, Maragno FP, Madalozz B, Prado C y Cechin SZ. 2013. Breeding sites of the leaf frog *Phyllomedusa tetraploidea* (Hylidae, Phyllomedusinae) in a forest remnant in southern Brazil. *North–Western Journal of Zoology* 9(2): 422–424.
- Dickinson AJG y Sive H. 2006. Development of the primary mouth in *Xenopus laevis*. *Developmental Biology* 295: 700–713.
- Downie JR, Nokhbatolfoghahai M, Bruce D, Smith JM, Orthmann-Brask N y MacDonald-Allan I. 2013. Nest structure, incubation and hatching in the Trinidadian leaf-frog *Phyllomedusa trinitatis* (Anura: Hylidae). *Phyllomedusa: Journal of Herpetology* 12(1): 13–32.
- Duellman WE y Trueb L. 1986. *Biology of Amphibians*. NewYork, McGraw-Hill.
- Duellman WE, Marion AB y Hedges SB. 2016. Phylogenetics, classification, and biogeography of the treefrogs (Amphibia: Anura: Arboranae). *Zootaxa* 4104(1): 1–109.
- Fabrezi M. 2011. Heterochrony in growth and development in anurans from the Chaco of South America. *Evolutionary Biology* 38: 390–411.
- Fabrezi M, Quinzio SI, Cruz JC, Chuliver Pereyra M, Manzano AS, Abdala V, Ponssa ML, Prieto Y y Goldberg J. 2017. Forma, tamaño y tiempo en la ontogenia de Anfibios y Reptiles. *Cuadernos de Herpetología* 31(2): 103–126.

- Faivovich J, Haddad CF, Garcia PC, Frost DR, Campbell JA y Wheeler WC. 2005. Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to Hylinae: phylogenetic analysis and taxonomic revision. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 2005: 1–240.
- Faivovich F, Haddad CFB, Baêta D, Jungfer KH, Alvares GFR, Brandão RA, Sheil C, Barrientos LS, Barrio-Amorós CL, Cruz CAG y Wheeler WC. 2010. The phylogenetic relationships of the charismatic poster frogs, Phyllomedusinae (Anura, Hylidae). *Cladistics* 25: 1–35.
- Faivovich J, Moravec J, Cisneros-Heredia DF y Kohler J. 2006. A new species of the *Hypsiboas benitezi* group from the western Amazon basin (Amphibia: Anura: Hylidae). *Herpetologica* 62: 96–108.
- Filadelfo T, Carvalho-Zimbres BQ, Dantas PD, Mello-Patiu CA y Albuquerque-Brandão R. 2013. Egg clutches and predation of *Phyllomedusa azurea* (Anura, Hylidae) nests in a temporary pond in Central Brazil. *Herpetology Notes* 6: 485–488.
- Frost DR. 2019. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 5.5 (14 de Enero, 2019). Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/> American Museum of Natural History, New York, USA.
- Gibbons ME y George MP. 2013. Clutch identity and predator-induced hatching affect behavior and development in a leaf-breeding treefrog. *Oecologia*, 171(4): 831–843.
- Gómez VI y Kehr AI. 2019. Habitat size changes morphological traits of *Physalaemus albonotatus* tadpoles. *Tropical Zoology* 32(1): 37–48.
- Gomez-Mestre I, Wiens JJ y Warkentin KM. 2008. Evolution of adaptive plasticity: risk-sensitive hatching in Neotropical leaf-breeding treefrogs. *Ecological Monographs* 78: 205–224.
- Gosner KL. 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica* 16: 183–190.
- Grosso JR, Baldo D y Vera Candiotti F. 2017. Heterochronic changes during embryonic development of neotropical foam nesting frogs (genus *Leptodactylus*). *Zoologischer Anzeiger* 266: 35–49.
- Günther R. 2006. Derived reproductive modes in New Guinean anuran amphibians and description of a new species with parental care in the genus *Callulops* (Microhylidae). *Journal of Zoology* 268: 153–170.
- Günther R y Richards SJ. 2005. Three new mountain stream dwelling *Litoria* (Amphibia: Anura: Hylidae) from Western New Guinea. *Russian Journal of Herpetology* 12: 195–212.

- Haddad CF y Prado CP. 2005. Reproductive modes in frogs and their unexpected diversity in the Atlantic Forest of Brazil. *BioScience* 55(3): 207–217.
- Hall JA, Larsen JH y Fitzner RE. 1997. Postembryonic ontogeny of the Spadefoot Toad, *Scaphiopus intermontanus* (Anura: Pelobatidae): external morphology. *Herpetological Monographs* 11: 124–178.
- Halloy M y Espinoza RE. 2000. Territorial encounters and threat displays in the Neotropical frog *Phyllomedusa sauvagii* (Anura: Hylidae). *Herpetological Natural History* 7: 175–80.
- Hensley FR. 1993. Ontogenetic loss of phenotypic plasticity of age at metamorphosis in tadpoles. *Ecology* 74:2405–2412.
- Heyer WR, McDiarmid RW y Weigmann DL. 1975. Tadpoles, predation and pond habitats in the tropics. *Biotropica* 7: 100–111.
- Jackson ME y Semlitsch RD. 1993. Paedomorphosis in the salamander *Ambystoma talpoideum*: effects of a fish predator. *Ecology* 74(2): 342–350.
- Jara FG. 2010. Plasticidad fenotípica en anuros Patagónicos de los géneros *Pleurodema* y *Rhinella*: respuestas al hidroperíodo y a los depredadores. Tesis Doctoral, Universidad Nacional del Comahue, Centro Regional Universitario Bariloche.
- Jungfer KH y Weygoldt P. 1994. The reproductive biology of the leaf frog *Phyllomedusa lemur* Boulenger, 1882, and a comparison with other members of the Phyllomedusinae (Anura: Hylidae). *Revue Francaise d'Aquariologie* 21: 57–64.
- Kehr AI, Schaefer EF, Duré MI y Gómez VI. 2014. Influence of light intensity, water volume and density in tadpoles raised in mesocosm experiments. *Journal of Zoology* 293(1): 33–39.
- Kenny JS. 1968. Early development and larval natural history of *Phyllomedusa trinitatis* Mertens. *Caribbean Journal of Science* 8: 35–45.
- Kim SJ, Jung J, Perez Arias SM, McDaniel JG y Warkentin KM. 2016. Shake and roll: Testing the ontogenetic correlation of vibration-cued hatching and otic mechanoreception in red-eyed treefrogs. *Integrative and Comparative Biology* 56: E315
- Lannoo MJ. 1999. Integration: Nervous and sensory systems. En: Tadpoles. The biology of anuran larvae. (Editores: RW McDiarmid y R Altig). The University of Chicago Press, Chicago, USA. pp 149–169.
- Laurent RF. 1967. Redescubrimiento de *Pithecopus pailona* (Shreve) en Argentina. *Acta Zoológica Lilloana* 22: 231–248.

- Laurila A. 2000. Behavioural responses to predator chemical cues and local variation in antipredator performance in *Rana temporaria* tadpoles. *Oikos* 88(1): 159–168.
- Laurila A, Kujasalo J y Ranta E. 1998. Predator-induced changes in life history in two anuran tadpoles: effects of predator diet. *Oikos* 1998: 307–317.
- Laurila A y Kujasalo J. 1999. Habitat duration, predation risk and phenotypic plasticity in common frog (*Rana temporaria*) tadpoles. *Journal of Animal Ecology* 68(6): 1123–1132.
- Lavilla EO. 1983. Contribución al conocimiento de los estados larvales de anuros argentinos. *Phyllomedusa pailona* Shreve. *Acta Zoológica Lilloana* 27: 5–13.
- Lavilla EO y Cei JM. 2001. *Amphibians of Argentina*. A second update, 1987–2000. Torino: Museo Regionale di Scienze Naturali. 186 p.
- Lawler SP. 1989. Behavioral-responses to predators and predation risk in 4 species of larval anurans. *Animal Behaviour* 38:1039–1047.
- Leips J y Travis J. 1994. Metamorphic responses to changing food levels in two species of hylid frogs. *Ecology* 75: 1345–1356.
- Lescure J, Marty C, Marty V, Starace F, Auber-Thomay M y Letellier F. 1995. Contribution a l'étude des amphibiens de Guyane Francaise. X. Les *Phyllomedusa* (Anura, Hylidae). *Revue Francaise d'Aquariologie* 22: 35–50.
- Licht LE. 1974. Survival of embryos, tadpoles, and adults of the frogs *Rana aurora aurora* and *Rana pretiosa pretiosa* sympatric in southwestern British Columbia. *Canadian Journal of Zoology* 52(5): 613–627.
- Lima SL y Dill LM. 1990. Behavioral decisions made under the risk of predation: a review and prospectus. *Canadian journal of zoology* 68(4): 619–640.
- Limbaugh BA y Volpe EP. 1957. Early development of the Gulf Coast Toad, *Bufo valliceps* Wiegmann. *American Museum Novitates* 1842: 1–32.
- Loman J. 1999. Early metamorphosis in common frog *Rana temporaria* tadpoles at risk of drying: an experimental demonstration. *Amphibia-Reptilia* 20(4): 421–430.
- Lopes Santos D, Ribeiro de Moraes A, Signorelli L, Pereira Bastos R, Feio R y Nomura F. 2018. Description of the Tadpole of *Phyllomedusa azurea* from the Brazilian Cerrado, with a Description of the Internal Oral Morphology of *Phyllomedusa oreades*. *Herpetologica* 74(1): 50–57.
- Lutz A y Lutz B. 1939. Notes on the genus *Phyllomedusa* Wagler. A) Observations on small Phyllomedusae without vomerine teeth or conspicuous parotids found in the region of Rio de Janeiro. B) *Phyllomedusa bahiana* Lutz. *Annaes da Academia Brasileira de Ciencias* 11: 219 –263.

- Márquez-García M, Correa-Solis M, Sallaberry M y Méndez MA. 2009. Effects of pond drying on morphological and life-history traits in the anuran *Rhinella spinulosa* (Anura: Bufonidae). *Evolutionary Ecology Research* 11(5): 803-815.
- Martin KLM. 1999. Ready and waiting: delayed hatching and extended incubation of anamniotic vertebrate terrestrial eggs. *American Zoology* 39: 279–288.
- McCollum SA y Leimberger JD. 1997. Predator-induced morphological changes in an amphibian: predation by dragonflies affects tadpole shape and color. *Oecologia* 109(4): 615–621.
- McCollum SA y Van Buskirk J. 1996. Costs and benefits of a predator-induced polyphenism in the gray treefrog *Hyla chrysoscelis*. *Evolution* 50(2): 583–593.
- McCoy MW, Bolker BM, Osenberg CW, Miner BG y Vonesh JR. 2006. Size correction: comparing morphological traits among populations and environments. *Oecologia* 148: 547–554.
- McDonald KR y Storch DR. 1993. A new reproductive mode for an Australian hylid frog. *Memoirs of the Queensland Museum* 34: 200.
- McNamara JM y Houston AI. 1994. The effect of a change in foraging options on intake rate and predation rate. *The American Naturalist* 144(6): 978–1000.
- Menzies JI. 1993. Systematics of *Litoria iris* (Anura: Hylidae) and its allies in New Guinea and a note on sexual dimorphism on the group. *Australian Journal of Zoology* 41: 225–255.
- Mitgutsch C, Olsson L y Haas A. 2009. Early embryogenesis in discoglossoid frogs: a study of heterochrony at different taxonomic levels. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 47: 248–257.
- Narayan EJ, Hero JM, Christi KS y Morley CG. 2011. Early developmental biology of *Platymanthis vitiana* including supportive evidence of structural specialization unique to the ceratobatrachidae. *Journal of Zoology* 284: 68–75.
- Navarro Acosta G y Vera Candiotti F. 2017. Alometría y heterocronías durante el desarrollo temprano de cinco especies de *Hypsiboas* (Anura: Hylidae). *Cuadernos de Herpetología* 31: 11–22.
- Navarro Acosta G, Baldo D, Kolenc F, Borteiro C y Vera Candiotti F. 2017. Embryonic morphology in five species of *Hypsiboas* (Anura: Hylidae). *The Herpetological Journal* 26: 121–132.
- Neckel-Oliveira S y Wachlevski M. 2004. Predation on the arboreal eggs of three species of *Phyllomedusa* in Central Amazônia. *Journal of Herpetology* 244–248.
- Newman RA. 1989. Developmental plasticity of *Scaphiopus couchii* tadpoles in an unpredictable environment. *Ecology* 70: 1775–1787.

- Nieuwkoop PD y Faber J. 1956. Normal table of *Xenopus laevis* (Daudin). A systematical and chronological survey of the development from fertilized egg till the end of metamorphosis. North Holland, Amsterdam, The Netherlands.
- Nokhbatolfoghahai M y Downie JR. 2005. Larval cement gland of frogs: comparative development and morphology. *Journal of Morphology* 263: 270–283.
- Nokhbatolfoghahai M y Downie JR. 2007. Amphibian hatching gland cells: Pattern and distribution in anurans. *Tissue y Cell* 39: 225–240.
- Nokhbatolfoghahai M y Downie JR. 2008. The external gills of anuran amphibians: Comparative morphology and ultrastructure. *Journal of Morphology* 269: 1197–1213.
- Nokhbatolfoghahai M, Downie JR y Ogilvy V. 2006. Surface ciliation of anuran amphibian larvae: Persistence to late stages in some species but not others. *Journal of Morphology* 267: 1248–1256.
- Nokhbatolfoghahai M, Downie JR, Clelland AK y Rennison K. 2005. The surface ciliation of anuran amphibian embryos and early larvae: Patterns, timing differences and functions. *Journal of Natural History* 39: 887–929.
- Nokhbatolfoghahai M, Mitchell NJ y Downie JR. 2010. Surface ciliation and tail structure in direct-developing frog embryos: a comparison between *Myobatrachus gouldii* and *Pristimantis* (= *Eleutherodactylus*) *urichi*. *The Herpetological Journal* 20: 59–68.
- Orizaola G, Dahl E y Laurila A. 2010. Compensating for delayed hatching across consecutive life-history stages in an amphibian. *Oikos* 119(6): 980–987.
- Pechenik JA. 2006. Larval experience and latent effects—metamorphosis is not a new beginning. *Integrative and Comparative Biology* 46(3): 323–333.
- Perotti MG, Jara FG y Úbeda CA. 2011. Adaptive plasticity of life-history traits to pond drying in three species of Patagonian anurans. *Evolutionary Ecology Research* 13(4): 415–429.
- Perotti MG, Pueta M, Jara FG, Úbeda CA y Moreno Azocar DL. 2016. Lack of functional link in the tadpole morphology induced by predators. *Current Zoology* 62(3): 227–235.
- Pezzuti TL, Leite FSF y Nomura F. 2009. The tadpole of *Phyllomedusa itacolomi* (Anura, Hylidae), with a description of the internal oral morphology. *South American Journal of Herpetology* 4(2): 117–124.
- Pucci Alcaide A, Alcaide MF, Pucci Alcaide FJ y Lavilla EO. 2011. The vesicles of *Phyllomedusa sauvagii* (Anura: Hylidae) nest. *South American Journal of Herpetology* 6(1): 20–26.

- Pyburn WF. 1963. Observations on the life history of the treefrog *Phyllomedusa callidryas* (Cope). Texas Journal of Science 15: 155–170.
- Pyburn WF. 1980. The function of the eggless capsules and leaf in nests of the frog *Phyllomedusa hypochondrialis* (Anura: Hylidae). Proceedings of the Biological Society of Washington 93: 153–167.
- Relyea RA. 2001. Morphological and behavioral plasticity of larval anurans in response to different predators. Ecology 82: 523–540.
- Relyea RA. 2003. Predators come and predators go: the reversibility of predator-induced traits. Ecology 84(7): 1840–1848.
- Reques R y Tejedo M. 1995. Negative correlation between length of larval period and metamorphic size in natural populations of natterjack toads (*Bufo calamita*). Journal of herpetology 29(2): 311–314.
- Reznick DN. 1990. Plasticity in age and size at maturity in male guppies (*Poecilia reticulata*) – an experimental evaluation of alternative models of development. Journal of evolutionary Biology 3:185–203
- Richards SJ y Oliver PM. 2006. A new species of torrent-dwelling *Litoria* (Anura: Hylidae) from the Kikori Integrated Conservation and Development Project area, Papua New Guinea. Salamandra 42: 231–238.
- Richardson MK, Hanken J, Gooneratne MI, Pieau C, Raynaud A, Selwood L y Wright GM. 1997. There is no highly conserved embryonic stage in the vertebrates: implications for current theories of evolution and development. Anatomy and Embryology 196: 91–106.
- Richter-Boix A, Llorente GA y Montori A. 2006. A comparative analysis of the adaptive developmental plasticity hypothesis in six Mediterranean anuran species along a pond permanency gradient. Evolutionary Ecology Research 8(6): 1139–1154.
- Richter-Boix A, Tejedo M y Rezende EL. 2011. Evolution and plasticity of anuran larval development in response to desiccation: a comparative analysis. Ecology and Evolution 1:15–25.
- Rodrigues DJ, Uetanabaro M y Lopes FS. 2007. Breeding biology of *Phyllomedusa azurea* Cope, 1862 and *P. sauvagii* Boulenger, 1882 (Anura) from the Cerrado, Central Brazil. Journal of Natural History 41: 1841–1851.
- Rogge JR y Warkentin KM. 2008. External gills and adaptive embryo behavior facilitate synchronous development and hatching plasticity under respiratory constraint. Journal of Experimental Biology 211(22): 3627–3635.
- Salica MJ, Haad MB, Vera Candioti F y Faivovich J. 2011. Early development of two species of *Phyllomedusa* (Anura: Phyllomedusinae). Salamandra 47: 144–154.

- Salica MJ, Vonesh JR y Warkentin KM. 2017. Egg clutch dehydration induces early hatching in red-eyed treefrogs, *Agalychnis callidryas*. *PeerJ* 5: e3549.
- Salthe SN. 1963. The egg capsules in the Amphibia. *Journal of Morphology* 113(2): 161–171.
- Schneider CA, Rasband WS y Eliceiri KW. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods* 9(7): 671–675.
- Schulze A, Jansen M y Köhler G. 2015. Tadpole diversity of Bolivia's lowland anuran communities: molecular identification, morphological characterisation, and ecological assignment. *Zootaxa* 4016(1): 1–111.
- Semlitsch RD y Caldwell JP. 1982. Effects of density of growth, metamorphosis, and survivorship in tadpoles of *Scaphiopus holbrooki*. *Ecology* 63(4): 905–911.
- Semlitsch RD, Scott DE y Pechmann JH. 1988. Time and size at metamorphosis related to adult fitness in *Ambystoma talpoideum*. *Ecology* 69(1): 184–192.
- Seymour RS. 1994. Oxygen diffusion through the jelly capsules of amphibian eggs. *Israel Journal of Zoology* 40(3–4): 493–506.
- Sih A y Moore RD. 1993. Delayed hatching of salamander eggs in response to enhanced larval predation risk. *American Naturalist* 142: 947–960.
- Smith DC y Van Buskirk J. 1995. Phenotypic design, plasticity, and ecological performance in two tadpole species. *The American Naturalist* 145(2): 211–233.
- Stearns SC. 1989. Trade-offs in life-history evolution. *Functional Ecology* 3: 259–68.
- Svensson ME y Haas A. 2005. Evolutionary innovation in the vertebrate jaw: a derived morphology in anuran tadpoles and its possible developmental origin. *BioEssays* 27: 526–532.
- Taylor AC y Kollros JJ. 1946. Stages in the normal development of *Rana pipiens* larvae. *The Anatomical Record* 94: 7–24.
- Thibaudeau DG y Altig R. 1988. Sequence of ontogenetic development and atrophy of the oral apparatus of six anuran tadpoles. *Journal of Morphology* 197: 63–69.
- Touchon JC y Warkentin KM. 2010. Short-and long-term effects of the abiotic egg environment on viability, development and vulnerability to predators of a Neotropical anuran. *Functional Ecology* 24(3): 566–575.
- Touchon JC y Wojdak JM. 2014. Plastic hatching timing by red-eyed treefrog embryos interacts with larval predator identity and sublethal predation to affect prey morphology but not performance. *PloS one* 9(6): e100623.
- Touchon JC, McCoy MW, Vonesh JR y Warkentin KM. 2013. Effects of plastic hatching timing carry over through metamorphosis in red-eyed treefrogs. *Ecology* 94: 850–860.

- Townsend DS y Stewart MM. 1985. Direct development in *Eleutherodactylus coqui* (Anura: Leptodactylidae): a staging table. *Copeia* 1985: 423–436.
- Travis J. 1984. Anuran size at metamorphosis: experimental test of a model based on intraspecific competition. *Ecology* 65(4): 1155–1160.
- Tyler MJ. 1963. A taxonomic study of amphibians and reptiles of the central highlands of New Guinea, with notes on their ecology and biology. 2. Anura: Ranidae and Hylidae. *Transactions of the Royal Society of South Australia* 86: 105–130.
- Tyler MJ y Davies M. 1978. Species-groups within the Australopapuan hylid frog genus *Litoria* Tschudi. *Australian Journal of Zoology, Supplementary Series* 63: 1–47.
- Tyler MJ y Davies M. 1979. Redefinition and evolutionary origin of the Australopapuan hylid frog genus *Nyctimystes* Stejneger. *Australian Journal of Zoology* 27: 755–772.
- Vaira M. 2001. Breeding biology of the leaf frog, *Phyllomedusa boliviana* (Anura, Hylidae). *Amphibia–Reptilia* 22: 421–429.
- Vaira M, Akmentins M, Attademo M, Baldo D, Barrasso D, Barrionuevo S, ... y Céspedes J. 2012. Categorización del estado de conservación de los anfibios de la República Argentina. *Cuadernos de Herpetología* 26: 131–159.
- Van Buskirk J y McCollum SA. 2000. Influence of tail shape on tadpole swimming performance. *Journal of Experimental Biology* 203(14): 2149–2158.
- Van Buskirk J, McCollurn SA y Werner EE. 1997. Natural selection for environmentally induced phenotypes in tadpoles. *Evolution* 51:1983–1992.
- Van Buskirk J, Anderwald P, Lüpold S, Reinhardt L y Schuler H. 2003. The lure effect, tadpole tail shape, and the target of dragonfly strikes. *Journal of Herpetology* 37(2): 420–425.
- Vargas S y Gutiérrez C. 2005. Cambios morfológicos y mortalidad en embriones y renacuajos de *Agalychnis spurrelli* Boulenger (Anura: Hylidae). *Actualidades Biológicas* 27: 189–202.
- Vera Candioti MF. 2007. Anatomy of anuran tadpoles from lentic water bodies: systematic relevance and correlation with feeding habits. *Zootaxa* 1600: 1–175.
- Vera Candioti F, Grosso J, Haad B, Pereyra MO, Bornschein MR, Borteiro C, Costa P, Kolenc F, Pie MR, Proaño B, Ron S, Stanescu F y Baldo D. 2016. Structural and heterochronic variations during the early ontogeny in toads (Anura: Bufonidae). *Herpetological Monographs* 30: 79–118.
- Vera Candioti F, Haad B, Baldo D, Kolenc F, Borteiro C y Altig R. 2011. Different pathways are involved in the early development of the transient oral apparatus in anuran tadpoles (Anura: Leiuperidae). *Biological Journal of the Linnean Society* 104: 330–345.

- Vera Candiotti F, Ponssa ML, Grosso J, Duport Bru AS y Lavilla E. 2018. La ontogenia como fuente de diversidad morfológica en los anuros. En: Morfología de Vertebrados. Conceptos, métodos y grupos de investigación en Argentina (Editores: V Abdala, A Manzano y A Vasallo). EUDEM. ISBN: 978-987-1921-87-4. pp 339–370.
- Vera Candiotti F, Taboada C, Salica MJ, Baldo D, Faivovich J y Baêta D. 2017. The Adhesive Glands during Embryogenesis in Some Species of Phyllomedusinae (Anura: Hylidae). *Journal of Herpetology* 51(1): 119–129.
- Vonesh JR. 2005. Egg predation and predator-induced hatching plasticity in the African reed frog, *Hyperolius spinigularis*. *Oikos* 110(2): 241–252.
- Vonesh JR y Bolker BM. 2005. Compensatory larval responses shift trade-offs associated with predator-induced hatching plasticity. *Ecology* 86(6): 1580–1591.
- Vonesh JR y Warkentin KM. 2006. Opposite shifts in size at metamorphosis in response to larval and metamorph predators. *Ecology* 87: 556–562.
- Ward D y Sexton OJ. 1981. Anti-predator role of salamander egg membranes. *Copeia* 1981(3): 724–726.
- Warkentin KM. 1995. Adaptive plasticity in hatching age: a response to predation risk trade-offs. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92: 3507–3510.
- Warkentin KM. 1999. Effects of hatching age on development and hatchling morphology in the red-eyed treefrog, *Agalychnis callidryas*. *Biological Journal of the Linnean Society* 68(3): 443–470.
- Warkentin KM. 2000a. Wasp predation and wasp-induced hatching of red-eyed treefrog eggs. *Animal Behaviour* 60(4): 503–510.
- Warkentin KM. 2000b. Environmental and developmental effects on external gill loss in the red-eyed tree frog, *Agalychnis callidryas*. *Physiological and Biochemical Zoology* 73: 557–565.
- Warkentin KM. 2002. Hatching timing, oxygen availability, and external gill regression in the tree frog, *Agalychnis callidryas*. *Physiological and Biochemical Zoology* 75(2): 155–164.
- Warkentin KM. 2005. How do embryos assess risk? Vibrational cues in predator-induced hatching of red-eyed treefrogs. *Animal Behaviour* 70(1): 59–71.
- Warkentin KM. 2007. Oxygen, gills, and embryo behavior: mechanisms of adaptive plasticity in hatching. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 148: 720–731.
- Warkentin KM. 2011a. Environmentally cued hatching across taxa: embryos respond to risk and opportunity. *Integrative and Comparative Biology* 51(1): 14–25.

- Warkentin KM. 2011b. Plasticity of hatching in amphibians: evolution, trade-offs, cues and mechanisms. *Integrative and Comparative Biology* 51: 111–127.
- Warkentin KM, Caldwell MS, Siok TD, D'Amato AT y McDaniel JG. 2007. Flexible information sampling in vibrational assessment of predation risk by red-eyed treefrog embryos. *Journal of Experimental Biology* 210(4): 614–619.
- Warkentin KM, Currie CR y Rehner SA. 2001. Egg-killing fungus induces early hatching of red-eyed treefrog eggs. *Ecology* 82(10): 2860–2869.
- Warkentin KM, Diaz JC, Güell BA, Jung J, Kim SJ y Cohen KL. 2017. Developmental onset of escape-hatching responses in red-eyed treefrogs depends on cue type. *Animal Behaviour* 129: 103–112.
- Wassersug RJ. 1975. The adaptive significance of the tadpole stage with comments on the maintenance of complex life cycles in anurans. *American Zoologist* 1975: 405–417.
- Wassersug RJ y Sperry DG. 1977. The relationships of locomotion to differential predation on *Pseudacris triseriata* (Anura: Hylidae). *Ecology* 58(4): 830–839.
- Weisz PB. 1945. The development and morphology of the larva of the South African clawed toad, *Xenopus laevis*. I. The third-form tadpole. *Journal of Morphology* 77: 163–192.
- Wells KD. 2007. *The Ecology and Behavior of Amphibians*. Chicago: University of Chicago Press.
- Werner EE. 1986. Amphibian metamorphosis: growth rate, predation risk, and the optimal size at transformation. *The American Naturalist* 128(3): 319–341.
- Werner EE y Gillian JF. 1984. The ontogenetic niche and species interactions in size-structured populations. *Annual Review of Ecology and Systematics* 15(1): 393–425.
- Wiens JJ, Kuczynski CA, Hua X y Moen DS. 2010. An expanded phylogeny of treefrogs (Hylidae) based on nuclear and mitochondrial sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 55: 871–882.
- Wilbur HM. 1980. Complex life cycles. *Annual Review of Ecology and Systematics* 11(1): 67–93.
- Wilbur HM y Collins JP. 1973. Ecological aspects of amphibian metamorphosis: nonnormal distributions of competitive ability reflect selection for facultative metamorphosis. *Science* 182(4119): 1305–1314.
- Willink B, Palmer MS, Landberg T, Vonesh, JR y Warkentin KM. 2014. Environmental context shapes immediate and cumulative costs of risk-induced early hatching. *Evolutionary Ecology* 28(1): 103–116.

Wojdak JM, Touchon JC, Hite JL, Meyer B y Vonesh JR. 2014. Consequences of induced hatching plasticity depend on predator community. *Oecologia* 175(4): 1267–1276.

AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento a la Comisión de Seguimiento y al Jurado por sus aportes y correcciones que ayudaron a mejorar el manuscrito final de esta Tesis.

A mi Directora Monique Halloy, con quién tuve el placer de formarme desde mis comienzos en esta carrera. Gracias por tanto Monique, vas a estar siempre en mis recuerdos, tu ausencia se siente, aún así dejaste mucho en las personas que tuvimos la suerte de conocerte.

A mis actuales Directores, Florencia Vera Candoti y Marcos Vaira. Gracias Flor por no dejarme bajar los brazos, todos estos años fueron de muchísimo aprendizaje al lado tuyo. A Marcos, gracias por recibirme e incluirme en tu grupo de trabajo y por tanta hospitalidad durante todos estos años.

A Karen Warkentin y todo su equipo, por tanta generosidad y darme la oportunidad de vivir una experiencia tan enriquecedora académica y pesonalmente.

A todo el Vaira's Lab: Andre, Ceci, Gri, José, Juan, Mauri, Noe, Nacho, Lu, Lucy y Sole. Quienes fueron mis amigos y compañeros durante éstos últimos 5 años, gracias por las salidas de campo, las charlas y las juntadas.

A los colectores de nidos Mauri y Diego.

A las Cuatreras, Fer y Lau, con ustedes todo fue inmesamente más divertido.

A mis amigas del segundo Ceci, Flor, Lau, Belén, Jime, Anita, Vivi, Tulli y todas las que vinieron despúes y me hicieron sentir tan bien cada vez que volvía al Lillo.

A mis amigas de siempre Jo, Ale, Ai, So, Lilí, Twi, Gi, De, Pau, Carlunchi, que supieron acompañar desde la distancia.

A mi familia, por el apoyo incondicional. Gracias papá por las oportunidades. A mi Madre por ser mi guía siempre. A mis hermanos Dina, Fer, Delia, Liza y David, por las palabras y el aliento. A cada uno de mis sobrinos, por ser una parte tan importante de mi vida. Gracias a mi familia política, Lucy y Darío, por el aguante.

A Mats, gracias por acompañarme, por la ayuda y el apoyo de todos estos años. Soy una afortunada de tenerte en mi vida.

Por último a León, sos todo hijo.

Esta Tesis fue desarrollada durante la beca doctoral otorgada por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).